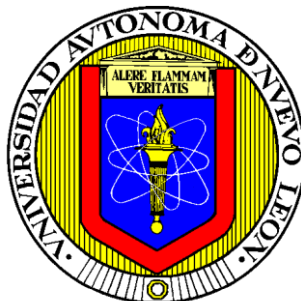


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES QUE PRESENTEN
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y CITOTÓXICA DE
Euphorbia pulcherrima, *Euphorbia trigona*, *Jatropha dioica*, *Ricinus communis* y
*Schinus molle***

POR

QBP Sonia Yesenia Silva Belmares

TESIS

**Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTOR EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS con Especialidad en Química de Productos Naturales**

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, NL

ENERO DE 2005

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES QUE PRESENTEN
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y CITOTÓXICA DE
Euphorbia pulcherrima, *Euphorbia trigona*, *Jatropha dioica*, *Ricinus communis*
y *Schinus molle***

Tesis

Presentada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en ciencias
biológicas con especialidad en Química de productos Naturales

Por

QBP Sonia Yesenia Silva Belmares

Dra. Catalina Rivas Morales
Director interno

Dra. Delia Elva Cruz Vega
Director Externo

Dra. Azucena Oranday Cárdenas
Codirector

Dra. Ma. Julia Verde Star
Asesor

Dra. Pilar Carranza Rosales
Asesor

RESUMEN

La búsqueda de compuestos con actividad antimicrobiana es de gran trascendencia debido a la dificultad que se presenta al combatir enfermedades causadas por microorganismos patógenos. En el presente trabajo se realizó un estudio biodirigido utilizando extractos de *Euphorbia pulcherrima*, *Euphorbia trigona*, *Jatropha dioica*, *Ricinus communis* y *Schinus molle* con la finalidad de encontrar metabolitos secundarios para combatir bacterias y hongos patógenos. Se determinó la actividad antimicrobiana de los extractos hexánicos, acetónicos y etanólicos sobre *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Trichophyton tonsurans*, *Sporotrix schenckii*. Los extractos de mayor actividad fueron fraccionados por cromatografía en capa fina, el efecto antimicrobiano se evaluó por bioautografía. La concentración mínima inhibitoria de las fracciones, así como su efecto citotóxico se determinaron por el método de reducción del MTT. Además se analizó la actividad citotóxica de los mismos sobre las líneas celulares normales CHANG (hígado humano), OK (riñón de zarigüeya) y LLCPK-1 (riñón de cerdo). Los extractos más activos fueron el extracto etanólico de hoja de *R. communis* que presentó mayor efecto sobre *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* y *C. parapsilosis*; el extracto etanólico de hoja de *S. molle* que mostró mayor efecto sobre *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* y *T. Tonsurans* y el extracto hexánico de raíz de *J. dioica* el cual mostró actividad fuerte sobre *S. aureus*. En los extractos etanólicos de *S. molle* y *R. communis* no se observó actividad en las fracciones separadas, a diferencia de lo encontrado en el extracto crudo, por lo que se sugiere un efecto sinérgico. En el extracto hexánico de la raíz de *J. dioica* se obtuvieron 3 bandas con efecto antimicrobiano con Rfs de 0.36, 0.46, y 0.84. La concentración mínima inhibitoria (CMI) de las fracciones activas con Rf de 0.36, 0.46 y 0.84 fue de 100, 200 y 400 µg/mL sobre *C. albicans*, *E. coli* y *S. aureus* respectivamente. Las CMI's de las fracciones 0.84 y 0.36 fueron 50 y 25 µg/mL sobre *C. neoformans*, respectivamente. Las fracciones obtenidas del extracto hexánico de raíz de *J. dioica* no presentaron citotoxicidad sobre las tres líneas normales utilizadas, obteniéndose una IC₅₀ > 1000 µg/mL. Se evidenció la presencia de esteroides y metilesteroides en las 3 fracciones así como en el extracto del cual provenían. Las fracciones 0.36 y 0.84 poseen grupo carbonilo e insaturaciones, además la de 0.36 reveló la presencia de triterpenos. Del análisis espectroscópico de masas realizado a las fracciones activas se elucidó la estructura química de la fracción 0.84 la cual correspondió al Stigmast-5-en-3-ol.

ABSTRACT

The search of compounds with antimicrobial activity is of great importance due to the difficulty that appears when fighting diseases caused by pathogenic microorganisms. In the present work a directed study was made using extracts of *Euphorbia pulcherrima*, *Euphorbia trigona*, *Jatropha dioica*, *Ricinus communis* and *Schinus molle* with the purpose of finding secondary metabolites to fight pathogenic bacteria and fungi. The antimicrobial activity of the hexanic, acetonic and etanolic extracts was determined on *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Trichophyton tonsurans*, *Sporotrix schenckii*. The extracts of greater activity were divided by thin layer chromatography, the antimicrobial effect was evaluated by bioautography. The minimum inhibition concentration of the fractions, as well as their cytotoxic effect was determined by the method of reduction of the MTT. In addition the cytotoxic activity of such was analyzed on cellular lines normal CHANG (human liver), OK (opossum kidney) and LLCPK-1 (pig kidney). The most active extracts were: the etanolic of leaf of *R. communis* that presented greater effect on *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* and *C. parapsilosis*; the etanolic extract of leaf of *S. molle* that showed greater effect on *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* and *T. tonsurans* and the hexanic extract by root of *J. dioica* which showed to strong activity on *S. aureus*. In the etanolic extracts of *S. molle* and *R. communis* was not observed activity in the separated fractions, unlike the found thing in the crude extract, reason why a synergic effect is suggested. In the hexanic extract by the root of *J. dioica* 3 bands with antimicrobial effect with R_f's of 0.36 were obtained, 0.46 and 0.84. The MIC of the active fractions with R_f's of 0.36, 0.46 and 0.84 was of 100, 200 and 400 µg/mL on *C. albicans*, *E. coli* and *S. aureus* respectively. The MIC's of 25 fractions 0.84 and 0.36 was 50 and µg/mL on *C. neoformans*, respectively. The obtained fractions of the hexanic extract by root of *J. dioica* did not present citotoxicity of on the three used normal lines, obtaining an IC₅₀ 1000 µg/mL. The presence of sterols and methysterols in the 3 fractions as well as in the extract was demonstrated from which they came. Fractions 0.36 and 0.84 have group carbonyl and restorations, in addition the one to 0.36 it revealed the presence of triterpens. Of the spectroscopic analysis of masses made to the active fractions showed the chemical structure of the fraction 0.84 which corresponded to Stigmast-5-in-3-ol.

1.- INTRODUCCIÓN

El inicio de la antibióticoterapia con el descubrimiento de la penicilina marca una parte crucial en la historia de la medicina. Los antibióticos se consideraban fármacos milagrosos, ya que las curaciones que se obtuvieron con penicilina y con estreptomicina asombraron al mundo, la primera en el manejo y curación de neumonías graves y la segunda en pacientes con tuberculosis (Levy S. B. y Marshall B., 2004; Crudu V., *et al.*, 2003).

La aparición de resistencia bacteriana a penicilina y estreptomicina impulsó la búsqueda de nuevos y mejores antibióticos; pronto aparecieron estos, cada uno con la expectativa de ser activo contra todo tipo de microorganismos sensibles o resistentes, o de convertirse en el fármaco mágico que terminaría con todas las infecciones. El mundo fue testigo de la introducción de cefalosporinas, aminoglicósidos, inhibidores de betalactamasas, macrólidos, glicopéptidos, carbapems, tetraciclinas, quinolonas y monobetalactámicos. Cada uno tenía cualidades exclusivas y se crearon grandes expectativas con estos compuestos. Sin embargo la aparición de resistencia a cada nuevo grupo de antibióticos fue destruyendo el sueño de encontrar un compuesto indefinidamente eficaz (Nordmann P. y Poirel L., 2002; Livermore D. M. y Woodford N., 2000; Wang H. *et al.*; 2001).

El fenómeno de la resistencia bacteriana se considera una crisis mundial. Tanto los enfermos como los clínicos enfrentan la aparición de bacterias multi-drogo resistentes y reaparición de infecciones emergentes que precisan de nuevos tratamientos debido a la presencia de bacterias para las cuales no existe terapia antimicrobiana actual. Aunque el arsenal de antibióticos es abundante y se ha logrado un gran avance en el tratamiento de infecciones cada vez más complejas, durante los últimos 60 años no se han descubierto medicamentos realmente novedosos, con mecanismos de acción capaces de modificar el espectro actual de cubrimiento y, lo que es más grave, de superar los mecanismos de resistencia bacteriana (Levy S. B., 2002).

Debido a esto, es de gran trascendencia la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana de origen vegetal; para lograr esto se hace necesario el uso de la investigación fitoquímica la cual cubre un amplio campo de trabajo cuyos objetivos principales son: aislar principios activos, identificarlos, determinar su estructura y encontrar sus posibles aplicaciones (Bilboa M., 1971).

Por lo cual la importancia en el estudio de las plantas medicinales es realizar análisis químicos y determinar su actividad biológica para de esta manera contribuir con validez científica al uso de las mismas como tratamiento (Huacuja E. R., 1995). La importancia de los productos naturales en medicina, se basa no solamente en sus efectos farmacológicos o quimioterapéuticos, sino en la posibilidad que ofrecen para poder desarrollar a partir de sus estructuras nuevas drogas, las cuales no deben ser más tóxicas para los órganos del ser humano que para el microorganismo a tratar (Phillipson J. D., 1994).

Existe un gran número de plantas de uso terapéutico para enfermedades provocadas por bacterias Gram negativas, Gram positivas y algunas especies de hongos que son oportunistas en pacientes inmunosuprimidos; para evaluar su eficiencia y garantizar su inocuidad se necesita tener programas de control de calidad donde exista identificación de especies con potencial, preparación de extractos, pruebas microbiológicas, además de la evaluación de la citotoxicidad de los mismos sobre líneas celulares de los órganos comúnmente afectados por los antibióticos conocidos, entre otras (Hodoshima N. *et al*; 2004; Huacuja E. R., 1995).

Numerosas son las investigaciones enfocadas a la búsqueda de nuevos compuestos con actividades biológicas a partir de fuentes naturales, dentro de ellos un gran número de estudios han sido dirigidos hacia la evaluación de actividades antimicrobianas en extractos y aceites esenciales de plantas medicinales y aromáticas. Para ello, se han empleado técnicas *in vitro* dada la sencillez y la reproducibilidad de las mismas. (Hernández D. L. y M. Rodríguez. 2001); por lo cual México ha ido sumándose a la corriente mundial en la búsqueda de nuevos antimicrobianos y a lo largo del país existen

instituciones científicas que se dedican a la búsqueda de diferentes actividades farmacológicas dentro del reino vegetal para lo cual la riqueza de la flora mexicana ofrece inagotables posibilidades. Por lo que con el objeto encontrar nuevas fuentes de metabolitos secundarios con esta actividad se seleccionaron *Jatropha dioica*, *Euphorbia pulcherrima*, *Euphorbia trigona*, *Ricinus communis* y *Schinus molle*.

2.- ANTECEDENTES

2.1.- COMPUESTOS DE PLANTAS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Algunas especies de la familia Euphorbiaceae y Anacardiaceae son cultivadas en México y se utilizan ampliamente en la medicina tradicional mexicana, que ha sabido aprovechar su rica flora y su vasta tradición en el empleo de fitofármacos, pero su aplicación sin aval científico representa un riesgo para la salud humana. Por esta razón en este estudio se propuso evaluar la actividad antimicrobiana y citotóxica de algunas plantas de estas familias.

Las familias Euphorbiaceae y Anacardiaceae son ricas en compuestos químicos tales como terpenoides, alcaloides, fenoles y ácidos grasos los cuales tienen usos etnofarmacéuticos; sin embargo algunos extractos de la familia de Euphorbiaceae presentan mezclas biológicamente activas las cuales son altamente corrosivas e irritantes para los organismos que las consumen y pueden activar la producción de plaquetas y prostaglandinas y aunque algunas promueven la formación de tumores otras exhiben actividad antineoplásica (Whelan L. C. y M. F. Ryan., 2003); por lo que es de vital importancia la evaluación de la actividad citotóxica de especies pertenecientes a estas familias.

Muchos metabolitos obtenidos de distintas especies de plantas presentan efectos antimicrobianos, como lo encontrado por Cateni F. et al., 2003 quienes determinaron que los glucocerebrósidos 1-*O*-(beta-D-glucopiranosil)-(2S,3S,4E,8E)-2N-[(2'R)-2'-hidroxi-hexadecanoil]-4 (E), 8-(E)-octadecadieno-1,3-diol y el 1-*O*-(beta-D-glucopiranosil)-(2S,3S,4R,8Z)-2N-[(2'R)-2'-hidroxitetraacosanoil]-8(Z)-octadeceno1,3,4-triol del extracto metanólico de *Euphorbia peplis* L. presentaron actividad antifúngica (Cateni F. et al., 2003).

2.2.- ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y COMPUESTOS ACTIVOS DE PLANTAS DE LA FAMILIA EUPHORBIACEAE

Existe una gran variedad de plantas de la familia Euphorbiaceae que presentan actividad antimicrobiana entre otras actividades biológicas; como el *Croton draco* el cual es una planta comúnmente llamada sangre de drago, presenta compuestos tales como 1-hidroxijunol, p-hidroxibenzaldehído, ácido p-metoxibenzoico, la scopoletina, dos alcaloides aporfinicos, ácidos diterpenicos 9(11)-dehidrokaurenico, clerodanos y éster forbol (Murillo R. M. *et al.*, 2001).

Los usos más comunes de esta planta originaria de México, son la aplicación directa del látex y la corteza en infecciones de la piel como herpes, sarna, caspa, seborrea y heridas externas leves; la infusión de la misma para dolor estomacal, diarrea, vómito, tuberculosis, úlceras bucales y lesiones en las encías; en lavados para los casos de llagas; como gárgaras, en dolor de garganta y otras afecciones bucales; y la corteza molida es usada en medicina tradicional para mordedura de víbora utilizada sobre la herida, se ha observado una inhibición total del área hemorrágica con los extractos acuosos, etanólicos y en etil acetato en bioensayos realizados en ratones basados en la inyección intradérmica del veneno de serpiente *Bothrops asper* (Castro O. *et al.*, 1999).

Debido a sus propiedades antivirales y antimicrobianas, Shaman Pharmaceuticals, una compañía de EE.UU., ha desarrollado productos a partir de *Croton lecheri* tales como Provir, un antidiarreico, y Virend, un antiherpético. (King S. R. y Tempesta M. S., 1994; DiCesare D. *et al.*, 2002).

En los extractos metanólicos de *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) se encuentran un gran número de compuestos tales como el ácido acetil aleuritico, stigmasterol, b-sitosterol, campesterol, beta-sitosterol-O-glucosido, sonderianina, catechina y galocatechina. Peres M. T. *et al.*, 1997 probaron la actividad antimicrobiana del extracto acuoso-etanólico y algunas fracciones del extracto metanólico y los compuestos aislados y se determinó que el ácido acetil aleuritico mostraba mejor

concentración mínima inhibitoria (MIC) contra *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimurium* (Peres M. T. *et al.*, 1997).

Wai H. *et al.* (1976) identificaron triterpenos de 2 especies de la familia Euphorbiaceae en Hong Kong. De *Claoxylon polot* identificaron 3 β -hidroxi-30-nor-lupan-20-ona y de *Fluggea virosa* fridelina, fridelano-3- α -ol, fridelano-3- β -ol, lupeol, glochilocudiol, ácido betulónico y sitosterol.

Desde hace años la medicina tradicional ha utilizado las hojas y los tallos de *Mallotus peltatus* (Geist) Muell. Arg. var *acuminatus* (Euphorbiaceae) para tratar infecciones intestinales, en piel y para disminuir la inflamación ocasionada por estas por lo cual Chattopadhyay D. *et al.*, 2002 probaron la actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos de hoja de esta especie observándose mayor actividad del extracto metanólico crudo sobre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis* y el hongo dermatofito *Microsporum gypseum* y además de probar la actividad antiinflamatoria del extracto y las fracciones obtenidas del mismo con n-butanol sobre ratas albinas observándose que el extracto metanólico presentaba actividad antiinflamatoria a 200 y 400 mg/kg, y las fracciones A y B obtenidas en n-butanol a 25 mg/kg. El estudio fitoquímico reveló la presencia de taninos, saponinas, terpenoides, esteroides en el extracto crudo y ácido ursólico, beta-sitosterol y algunos ácidos grasos como principales compuestos (Chattopadhyay D. *et al.*, 2002). Por otra parte Taylor R. S. *et al.*, 1996; observaron que la exposición a la luz ultravioleta aumentaba la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de *Mallotus philippensis* (Euphorbiaceae) sobre bacterias gram-positivas y gram-negativas (Taylor R. S. *et al.*, 1996).

Irobi O. N. *et al.*, 1994; determinaron las propiedades antimicrobiana y fitoquímica de los extractos etanólicos de *Bridelia ferruginea* (Euphorbiaceae), los extractos se probaron a una concentración de 5 mg / mL produciendo actividad sobre *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus lactis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus pyogenes* y *Klebsiella sp.* Los

exámenes fitoquímicos mostraron la presencia de fenoles y taninos (Irobi O. N. *et al.*, 1994).

Euphorbia resinifera Berg./Syn *E. officinarum* (Euphorbiaceae) presenta sustancias activas irritantes para la piel, principios amargos, euforbón, sales de calcio y sodio, caucho y otras. El látex seco de la planta es el producto medicinal de la planta llamado Euphorbium; esta planta se ha utilizado como componente de preparados laxantes y de emplastos para veterinaria; en homeopatía se emplea contra las afecciones cutáneas, catarros y contra la diarrea (Hergenhahn M. *et al.*, 1984).

Seung H. L. *et al.* (1990) realizaron una investigación química de *Euphorbia thymifolia* que es una planta medicinal usada en Taiwán como diurética, laxante y en problemas intestinales y de la piel. La planta tiene propiedades astringentes. Ellos aislaron y caracterizaron un compuesto hidrolizable llamado ácido isomalotínico junto con 15 taninos conocidos, la estructura de este ácido fue determinada por bases espectroscópicas y pruebas químicas.

Starratt A. N., (1971) identificó alcoholes de cadena larga en especies de *Euphorbia*. La estructura de estos alcoholes provenientes de 4 especies de *Euphorbia* ha sido investigada por cromatografía de gases-líquidos. El alcohol aislado de *E. polygonifolia*, previamente reportado como 1-hexacosanol, se identificó como 1-octacosanol, contrariamente a lo que otros investigadores sugieren; el principal constituyente de la mezcla de alcoholes de *E. cyparissias* y *E. esula* ha sido confirmado como 1-hexacosanol (Starratt A. N., 1971).

Euphorbia trigona también se conoce como *Euphorbia neriifolia*, el jugo de esta planta es usado como purgativo y expectorante y aplicado localmente como rubefaciente; además la raíz se utiliza como antiespasmódico, el látex es usado externamente como catártico para aliviar el dolor de oídos, remover verrugas, se aplica también en hemorroides, úlceras, costras, inflamación glandular para prevenir la formación de pus y exudación, además de administrarse internamente en desordenes de hígado y bazo, sífilis, edema, enfermedades de la piel, tos y asma (Mitchell J. y G. Breyer., 1962).

Euphorbia pulcherrima también llamada ajoyo (lengua de zoque, Chiapas), bandera (Durango), bebeta (Veracruz), catalina (Oaxaca), cuitlazochitl (lengua nahuatl) y euforbia de catargo. El color de sus flores puede ser blanco, rojo o rosa, las partes venenosas de esta planta son las hojas y la savia. (Martínez M., 1936).

Euphorbia pulcherrima se encuentra dentro de la lista de plantas tóxicas conocidas y causa daño al humano. Como casi todas las Euphorbias, *E. pulcherrima* contiene en las hojas, flores y tallo un látex extremadamente venenoso que al contacto con la piel y en las mucosas produce lesiones de consideración. Este látex contiene cantidades variables de resina, glucosa, fenoles, alcaloides, diastasas, y protéidos. Produce estomatitis, descamación del epitelio de los labios y de la nariz, la mucosa bucal presenta focos necróticos y vesículas; en ocasiones el proceso inflamatorio se generaliza y hay estomatitis ulcerosa y gastroenteritis. A pesar de que no se produzca la muerte, las afecciones pueden ser severas, generalmente se observa que en casos de intoxicación accidental en humanos podría producirse la muerte por ingestión de las hojas de esta especie (Smith K. I. et al., 1996).

En los estudios realizados no se han encontrado diterpenos que se encuentran en otras especies de Euphorbias y estudios realizados en ratas demuestran que altas dosis de los extractos de *E. pulcherrima* no producen mortalidad o síntomas de toxicidad y tampoco hay cambios en la conducta de estos animales (Stone R. P., W. J. Collins., 1971).

Sekula C. y Nes W. R., 1980 identificaron colesterol y otros esteroides en *E. pulcherrima*. Encontraron un 0.07 % del compuesto dimetil tetracíclico por espectroscopia de resonancia magnética nuclear de ^1H (Sekula C. y Nes W. R., 1980).

Ricinus communis es conocido vulgarmente como ricino o higuera, entre otros nombres comunes como palmacristi y xoxopajtzi. La semilla contiene un aceite y un alcaloide llamado ricina. Cuando se purifica, el aceite de ricino toma un leve color amarillo y funciona como purgante el cual se emplea a dosis limitadas (Villacis L., 1978).

La ricina es uno de los venenos más potentes que se conocen, la ricina de una sola semilla puede producir la muerte a un niño. Sin embargo gracias al método que se emplea para extraer el aceite de ricino, este queda libre del veneno sin perder la ricinoleína, a la que se deben sus propiedades purgantes. Para los pobladores del antiguo Egipto, el aceite de ricino no solo servía de purgante, sino de ungüento y combustible para lámparas. Tres veces al mes lo bebían mezclado con cerveza para mantener limpio el intestino. Los griegos y romanos, quizás por temor a la toxicidad de la planta, lo destinaban exclusivamente al uso externo, y ningún pueblo volvió a emplearlo como purgante sino hasta finales del siglo XVIII (Sánchez O., 1980; Argent R. H. *et al.*, 1994).

La infusión de las hojas de ricino es un remedio Zulú para el estómago y se administra oralmente o como un enema; también se aplica una pasta de la raíz para dolor de muelas, la raíz se utiliza como un remedio Chaga para la diarrea. Las pruebas contra bacterias han dado resultados positivos o negativos dudosos. En otros estudios se ha encontrado inhibición de las hojas contra *M. tuberculosis* (Mitchell J. y G. Breyer., 1962).

Malcom J. T. and W. S. Bowers (1967) aislaron de *R. communis* L. el lupaneol y lo identificaron como el principal constituyente con apariencia de una capa fina cristalina además de aislar e identificar la 30-Norlupan-3 β -ol-20 ona (Malcom J. T. and W. S. Bowers., 1967).

En las investigaciones realizadas por Aiyelaagbe O., (2000) se observó que todos los extractos (hexánicos, clorofórmicos y metanólicos) de la raíz de *Jatropha podagrica* mostraban actividad antimicrobiana a 20 mg/mL. Los extractos hexánicos resultaron ser los más activos sobre *S. auerus* y *B. cereus* mostrando actividad antimicrobiana comparable a la gentamicina y sobre *C. albicans* se observó actividad antifúngica moderada (Aiyelaagbe O., *et al.*, 2000).

El látex de *Jatropha curcas* L. es usado para tratar hemorroides y quemaduras debido a sus propiedades antiinflamatorias y antisépticas, además se utiliza para fumigar chinches

y los venenos pueden mezclarse con aceite palmítico para envenenar ratas. En Bayano Cuna se utiliza esta planta como purgativa. En ensayos realizados por Mujumdar A. M. Y Misar han demostrado que reduce la formación de tejido granular y la migración de leucocitos hacia los vasos (Mujumdar A. M. y Misar A. V., 2004).

Jatropha multifida L. es una planta descrita por Seemann en Panamá en el siglo XIX. Los tubérculos cocidos son comestibles, el fruto, látex y las semillas son venenosos, purgativos y se usan como antifebrífugos y en enfermedades venéreas. Los extractos hexánicos, etil acetato, clorofórmicos y metanólicos de la raíz de *J. multifida*, inhiben el crecimiento de *B. subtilis* y *S. aureus* a concentración de 200 µg/disco (Levin Y. 2000).

Can A., *et al* (2004); encontraron que los compuestos 2-epi-jatrogrossidiona y el diterpenramnofolano obtenidos de *J. gaumeri* presentaban actividad antimicrobiana. Además identificaron β -sitosterol, y los terpenos α y β -amirina y taraxasterol como metabolitos con actividad antioxidante

Adolf W., *et al.*, (1983) estudiaron los derivados irritantes del forbol de 4 especies de *Jatropha* que se usan en medicina tradicional los cuales fueron analizados mediante cromatografía. Los constituyentes encontrados fueron esteres poliinsaturados de diterpeniodes tipo tiglianos y 16 hidroxiforbol.

Chatterjee A., *et al.*, (1981) mediante análisis de rayos X describieron la estructura cristizable de un lignano, el compuesto 2-piperonilideno-3-veritril-3-R- γ -butirolactona de *Jatropha gossypifolia*,

Jatropha dioica se conoce comúnmente como sangre de drago, drago, sangregado, batacora, coatli, gualulo, piñón de cerro, tacote prieto, teleondilla y tlapalezpatli. Es una planta medicinal muy conocida, contiene un látex acuoso casi incoloro que se vuelve rojo al contacto con el aire y mancha como si fuera sangre, de ahí el origen de su nombre común. La fama medicinal de la que goza la sangre de drago se debe al alto contenido de taninos en su látex, que le confiere propiedad astringente; todas sus aplicaciones terapéuticas se basan en ésta característica (Yougken W., 1951).

Es utilizado en la medicina doméstica preparando cocimientos para diversos fines: ingerido sirve para controlar la diarrea, en enemas para desinflamar las hemorroides, en la boca para afirmar los dientes y endurecer las encías, en gargarismos para tratar la irritación e inflamación de la garganta y en lavados es ampliamente utilizada en toda la región amazónica para curar heridas, problemas cutáneos, en diversas erupciones de la piel, como cicatrizante y antiséptico. Como shampoo para evitar la caída del pelo y para darle brillo, algunos herbolarios recomiendan darse fricciones en el cuero cabelludo con la raíz macerada en alcohol. En Oaxaca se usa la sangre de drago para el escorbuto y la piorrea. Localmente se aplica el cocimiento de la raíz contra las hemorroides y al interior como astringente débil, también se utiliza como agente antirreumático (Martínez M. 1936; Villarreal A. M. y X. Domínguez., 1988; Yougken W., 1951).

Villarreal A. M. y X. Domínguez., (1988) mencionan que los extractos de las raíces y tallos de especies de *Jatropha* (Euphorbiaceae) presentan diterpenoides biológicamente activos; además de otros compuestos como el alcohol tricíclico denominado jaherina, aislada de *Jatropha zeyheri*, el cual presenta actividad antimicrobiana. Además se ha demostrado que *Jatropha macrohiza* contiene un diterpenoide tetracíclico llamado jatrophatriona el cual inhibe el crecimiento de células de leucemia linfocítica. En los estudios llevados a cabo por Villarreal se encontraron citralitriona el cual es un diterpenoide epóxido que se aisló de los extractos de raíz de *J. dioica*, en este estudio también se identificó la presencia de β -sitosterol, jatropholona B y riolozatriona. Se sabe también que *J. dioica* es usada en el tratamiento de enfermedades bucales y el cáncer de piel y que el β -sitosterol es un componente con efectos antimicrobianos que también se encuentra presente en otras especies de plantas de la misma familia (Villarreal A. M. y X. Domínguez., 1988).

Sánchez, C. A., (1995) encontró que los extractos alcohólicos y acuosos de 33 plantas incluyendo *Jatropha dioica* y *Schinus molle* (pirul) inhibían con diferente intensidad el crecimiento de algunas bacterias que causan enfermedades gastrointestinales, como *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella thyphimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia*

enterocolitica, *Shigella dysenteriae*, *Clostridium perfringens* y *Proteus vulgaris*. Se encontró que los extractos etanólicos de *Jatropha dioica* inhibían a *B. cereus* y *S. aureus*; mientras que los extractos acuosos no mostraban inhibición sobre ninguno de los microorganismos estudiados. Los extractos acuosos de *S. molle* mostraron inhibición sobre *B. cereus*, *E. aerogenes*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. thyphimurium*, *Proteus vulgaris* y *S. aereus*. Mientras que los extractos etanólicos de *Schinus molle* solo presentaron efecto sobre *S. aereus* y *V. cholerae*.

2.3.- ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y COMPUESTOS ACTIVOS DE PLANTAS DE LA FAMILIA ANACARDIACEAE

El *S. molle* (pirul) pertenece a esta familia, la que debió ser introducida a México durante los primeros años de la colonia por Francisco Hernández, botánico español que realizó aquí sus investigaciones entre 1570 y 1577; Molle es el nombre quechua del pirul, que Linneo conservó al designar científicamente la especie, con el que también lo conocieron los antiguos mexicanos (Martínez M., 1936).

Todas las partes del árbol *S. molle* incluyendo sus hojas, corteza, frutos, semillas, resina y oleoresina o bálsamo han sido usadas en la medicina tradicional de regiones tropicales,. Todas las partes de este árbol tienen gran contenido de aceite y aceites esenciales los cuales poseen una esencia aromática picante. Las hojas liberan el aceite al ser calentadas en agua. Esta planta también se ha utilizado en sur y centro América donde ha sido reportada como analgésico, antibacteriano, antidepresivo, antifúngico, antiviral, antiespasmódico, astringente, balsámico, citotóxico, diurético, expectorante, hipotensivo, purgante, estomático, tónico, uterino, estimulante (Kramer F. L., 1957; Ross S., 1980).

Nurit B., *et al* (1981) determinaron las propiedades de la lacasa aislada de *S. molle* como una glicoproteína que cataliza la oxidación de *o* y *p*-difenoles, también describieron su composición de aminoácidos y carbohidratos.

Domínguez X. A., 1970 trabajó con los exudados gomosos del fruto del pirul que fue colectado en Monterrey N. L. La extracción de los compuestos fue realizada en éter de petróleo, éter etílico y etanol. A estos extractos se les realizó cromatografía en sílica gel. En el extracto con éter de petróleo se determinó ácido lignocérico $C_{24}H_{48}O_2$, se detectó también β -sitosterol eluído con benceno- $CHCl_3$ y quercetina eluída con EtOH (Domínguez X. A., 1970).

Gundidza M., (1993) probó el aceite esencial de las hojas frescas de *S. molle* aisladas por hidrólisis para determinar la actividad antibacteriana por el método de difusión y actividad antifúngica usando el micelio o el crecimiento de una sola célula para el método de inhibición. Los resultados obtenidos muestran que el aceite volátil posee actividad significativa contra las siguientes especies de bacterias: *Klebsiella pneumoniae*, *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Leuconostoc cremoris*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Clostridium sporogenes*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Escherichia coli*, *Benecka nitrigens*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marscecens*, *Bacillus subtilis* y *Brochotrix thermosphacata* y con las especies fúngicas *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium colmorum* y *Alternaria alternata*.

Dikshit A., *et al.*, 1986 encontraron que el aceite esencial de *S. molle* mostraba una actividad fungistática máxima sobre algunos hongos comunes de almacén como *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus* Link, y *Penicillium italicum* o sobre hongos patógenos de animales como *Epidermophyton floccosum*, *Histoplasma capsulatum*, *Microsporium canis*, *Microsporium ferrugineum*, *Trichophyton equinum*, y *Trichophyton tonsurans*. Las concentraciones fungistáticas mínimas del aceite esencial de *S. molle* fueron de 300, 200, y 200 ppm sobre *M. gypseum*, *T. mentagrophytes*, y *T. rubrum*,

respectivamente y de 900 ppm sobre *T. mentagrophytes* y 400 ppm sobre *T. rubrum* (Dikshit A., et al., 1986).

S. molle y *S. terebinthifolius* son inhibidores de algunos virus y se han usado para preservar algunos productos alimenticios; en 1963 se hizo un estudio de varias plantas que inhiben virus en el que se incluyen estas 2 especies y se mencionan datos sobre los tipos de virus que inhiben (Carmona F. J., 1970).

Martínez M. J. et al., 1996 probaron los extractos de *Schinus terebenthifolius* sobre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans* encontrando que una mayor inhibición sobre *Staphylococcus aureus* (Martínez M. J. et al., 1996).

S. molle se ha usado también como pesticida formando algunos compuestos clorados (Hylin J.W. y E. E Spenyer., 1966). Por otra parte existen estudios estructurales de *S. terebinthifolius* donde se aislaron 2 triterpenos: el Schinol y la Terebintona (Nuñez M. S., 1953).

Ruffa M. J., 2002 encontró que el extracto metanólico de *S. molle* presentaba actividad sobre la línea de carcinoma hepatocelular Hep G2 con una IC50 de $50 \pm 7 \mu\text{g} / \text{mL}$ (Ruffa M. J., 2002).

2.4.- JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades microbianas son una preocupación mundial y representan una amenaza para la salud pública, sobre todo en pacientes inmunosuprimidos. Debido a la resistencia antimicrobiana adquirida por un gran número de microorganismos dentro de los cuales encontramos bacterias, hongos, virus y parásitos, es necesaria la búsqueda de nuevos compuestos antimicrobianos. Por otro lado los antibióticos de nueva generación además de su costo elevado, producen efectos secundarios adversos y son tóxicos para órganos vitales como hígado y riñón. Por estos motivos, la utilización de plantas para el descubrimiento de nuevos agentes antimicrobianos, que sean capaces de destruir microorganismos y que produzcan menos efectos tóxicos en el organismo humano ha adquirido gran importancia.

Por los motivos anteriormente expuestos, en esta investigación consideramos relevante la evaluación de la actividad antimicrobiana y citotóxica de algunas especies de las familias Euphorbiaceae (*Jatropha dioica*, *Euphorbia pulcherrima*, *Euphorbia trigona* y *Ricinus communis*) y Anacardiaceae (*Schinus molle*) las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en México y han sido usadas en medicina tradicional en algunos padecimientos infecciosos.

2.5.- PLANTAS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO

Schinus molle

Clasificación botánica

REINO: Plantae, DIVISION: Spermatophyta, SUBCLASE: Monocotyledonea, CLASE: Angiospermae, ORDEN: Sapindales, SUBORDEN: Anacardiinae, FAMILIA: Anacardiaceae, GENERO: *Schinus* ESPECIE: *molle*

Descripción botánica

S. molle de la familia Anacardiaceae perteneciente al orden Sapindales, contiene alrededor de 60 géneros y 400 especies (Brickell C., 1989; Cano. G. y Cano., 1994). Es un árbol de 15 m de alto, ramas numerosas, delgadas y colgantes como de 3 m de largo, desarrollándose desde el nivel del suelo; hojas con pecíolos de 2-3 cm de largo arregladas imparipinadamente, largos gruesos y membranosos; hojuelas de 15-40 mm, sésiles, lanceoladas o linerlanceoladas, de 6 cm de largo, cuneadas u obtusas en la base, acuminadas o raramente agudas en el ápice, la punta usualmente curveada, entera o casi entera, ligeramente café arriba; panículas blanco-amarillas, con tricoma simple; pétalos angostamente ovados; truncados y glabros de 12 mm de largo (Yougken W., 1951; Maiti R., 1991; Brickell C., 1992).

Presenta flores unisexuales muy pequeñas agrupadas en panículas axilares; cáliz de 4-5 piezas, corola de 4-5 pétalos de color amarillo verdoso en las flores masculinas y blanco verdoso en las femeninas; 10 estambres; un estilo trífido. El fruto en una drupa pequeña, carnosa que va secando al madurar y contiene una sola semilla. Florece de marzo a mayo y se multiplica mediante semillas en primavera o bien a través de los esquejes semimaduros obtenidos en verano (Brickell C., 1992).

Distribución geográfica

Nativo de Sudamérica, se ha hecho silvestre en la Meseta Central y está naturalizado en nuestro país. Es un árbol procedente del Perú; se encuentra en matorrales xerófilos,

pastizales o se cultiva como árbol de sombra en plazas, jardines y orillas de caminos (Brickell C., 1992).

Jatropha dioica

Clasificación botánica

REINO: Plantae, DIVISION: Spermatophyta, SUBCLASE: Dicotyledoneae, CLASE: Dicotyledoneae, CLASE: Angiospermae, ORDEN: Geraniales, SUBORDEN: Tricocceae, FAMILIA: Euphorbiaceae, GENERO: *Jatropha* ESPECIE: *dioica*

Descripción botánica

Arbusto subarbusto dioico, de 0.5 a 1.50 m de altura. Tallos succulentos, gruesos de color parduzco, marcados por las cicatrices que dejan las hojas al caer. Hojas carnosas agrupadas en hacecillos, sésiles o con pecíolo, muy corto, espatuladas, de bordes lisos, a veces lobulados, y nervaduras manifiestas, sobre todo por el envés. Flores también agrupadas en hacecillos junto a las hojas, con corola blanquecina de 5 pétalos unidos que forman un tubo; las masculinas tienen 10 estambres y el cáliz más corto que la corola; las femeninas tienen el cáliz del mismo largo que la corola y el ovario con uno o dos lóbulos y 1 ó 2 estilos. El fruto es una cápsula ligeramente alada, con frecuencia, se encierra en una sola semilla. Florece alrededor de septiembre (Rzedowsky J., 1981).

Distribución geográfica

Habita en matorrales Xerófilos de zonas desérticas y semidesérticas; es nativa de Norteamérica, se extiende del suroeste de los Estados Unidos a México; donde crece silvestre desde Chihuahua hasta Oaxaca (Rzedowsky J., 1981).

Ricinus communis

Clasificación botánica

REINO: Plantae, DIVISION: Spermatophyta, SUBCLASE: Dicotyledoneae, CLASE: Angiospermae, ORDEN: Geraniales, SUBORDEN: Tricocceae, FAMILIA: Euphorbiaceae, GENERO: *Ricinus* ESPECIE: *communis*

Descripción botánica

Arbusto o arbolito de tallo hueco, glabro. Hojas alternas palmeadas, palmatilobuladas, con lóbulos acuminados y dentados. Racimos terminales; las flores superiores masculinas y las inferiores femeninas. El fruto es una cápsula erizada, con aguijones rojizos (Villacis L., 1978).

Distribución geográfica

Es una planta originaria de África tropical, del mediterráneo; cultivada en zonas cálidas; en muchos lugares se le encuentra semi-silvestre. En México se introdujo desde Europa; se encuentra silvestre y cultivado en regiones cálidas de Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Veracruz, Tabasco y Chiapas; aunque crece en abundancia en el estado de Oaxaca, se encuentra en campos de cultivos abandonados, encinares, vegetación costera y mezcla arvense y ruderal. Es una planta herbácea y vivaz, a veces arbustiva, que llega a medir hasta 6 m de altura; tallo grueso, irregular, hueco, nudoso, verde rojizo, Hojas alternas con nervaduras rojizas y pecíolo largo, peltadas, palmeadas, con lóbulos lanceolados de bordes irregularmente dentados. Flores unisexuales, apétalas, agrupadas en racimos paniculados terminales, las masculinas en la parte inferior, y las femeninas en la parte superior.

El fruto es una cápsula erizada de pelos, ovalada, que se abre en 3 valvas bipartidas y contiene 3 semillas grandes, elípticas algo aplanadas, lisas, brillantes de color gris jaspeado. Los frutos maduran entre agosto y octubre. El aceite de ricino se emplea como emoliente en ungüentos y cosméticos, pero sobre todo como laxante de acción suave y muy eficaz (Martínez M., 1936; Villacis L., 1978).

Euphorbia pulcherrima

Clasificación botánica

REINO: Plantae, DIVISION: Spermatophyta, SUBCLASE: Dicotyledoneae, CLASE: Angiospermae, ORDEN: Geraniales, SUBORDEN: Tricocceae, FAMILIA: Euphorbiaceae, GENERO: *Euphorbia*, ESPECIE: *pulcherrima*

Descripción botánica

Es un árbol o arbusto de 2 a 6 metros de altura, de ramas glabras, con jugo lechoso, hojas grandes y oblongas con pequeños lóbulos, largamente pecioladas; brácteas de las inflorescencias, desnudas como hojas de color rojo (Villacis L., 1978).

Distribución geográfica

Es originaria de México; se distribuye en Chiapas, Distrito federal, Durango, Estado de México, Guerrero, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Tlaxcala y Veracruz. (Villacis L., 1978).

Euphorbia trigona

Clasificación botánica

REINO: Plantae, DIVISION: Spermatophyta, SUBCLASE: Dicotyledoneae, CLASE: Angiospermae, ORDEN: Geraniales, SUBORDEN: Tricocceae, FAMILIA: Euphorbiaceae, GENERO: *Euphorbia* ESPECIE: *trigona*

Descripción botánica

Son diversos los ejemplares de *Euphorbiaceae* entre los cuales se destacan, por su belleza y por el porte majestuoso, algunos ejemplares gigantes de *Euphorbia abyssinica* y de *E. candelabrum*; mientras otros, como *Euphorbia trigona*, *E. caerulescens* y *E. resinifera*, forman densas matas.

Euphorbia trigona es un arbusto espinoso de hasta 6 pies de alto (1.8 m) necesidades de riego moderado en verano, debe mantenerse seco para los cortes de propagación del invierno. Es una planta que necesita protección a las heladas en Phoenix. Necesita una temperatura mínima de exposición a el sol de 55°F (12°C), tiene hábitos occidentales tropicales del crecimiento de África. Esta planta pudiera ser que alguien la confundiera con una cactácea con hojas, pero está más estrechamente relacionada con las flores de nochebuena que con las cactáceas, in embargo ocupa los mismos ecosistemas que los cactus. Las flores son insignificantes, según descripciones extranjeras, no hay registros sobre de que florece en Brasil, aunque está muy bien adaptado al clima, presenta

espinas dorsales minúsculas y las hojas pequeñas en la extremidad. Tiene una savia lechosa que puede ser venenosa y causar la irritación de piel. Puede ser propagada de cortes del vástago (Mitchell J. y G. Breyer., 1962).

Distribución geográfica

Es originaria de Sudáfrica occidental, de la india se ha dicho que crece en varias partes de Brasil como: Bellevue, Clayton, Encino, Mil robles, Forsyth y Rockledge, además se encuentra distribuida en el norte de México como planta ornamental. (Mitchell J. y G. Breyer., 1962)



Figura 1.- *Jatropha dioica*



Figura 2.- *Ricinus communis*



Figura 3.- *Euphorbia pulcherrima*



Figura 4.- *Euphorbia trigona*



Figura 5.- *Schinus molle*

2.6.- HIPOTESIS

Los metabolitos secundarios obtenidos de los extractos *Jatropha dioica*, *Euphorbia pulcherrima*, *Euphorbia trigona*, *Ricinus communis* y *Schinus molle* presentan actividad antimicrobiana y/o citotóxica.

3.- OBJETIVO GENERAL

Identificación de los componentes que presenten actividad antimicrobiana y citotóxica de *Euphorbia pulcherrima*, *Euphorbia trigona*, *Jatropha dioica*, *Ricinus communis* y *Schinus molle*.

3.1- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Colectar e identificar el material vegetal de estudio.
2. Obtener extractos de las plantas: *Jatropha dioica*, *Euphorbia pulcherrima*, *Euphorbia trigona*, *Ricinus communis* y *Schinus molle* con solventes de diferente polaridad.
3. Evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos sobre: *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25619, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* ATCC 752, *Candida parapsilosis*, *Trichophyton tonsurans*, *Sporotrix schenckii*.
4. Separar las fracciones del extracto activo y evaluar su actividad antimicrobiana por bioautografía
5. Evaluar la citotoxicidad de los extractos y fracciones activas de las plantas en estudio sobre: células CHANG (hígado humano) y OK (Riñón de zarigüeya), LLCPK-1 (riñón de cerdo).
6. Identificar los grupos funcionales y metabolitos secundarios de las fracciones activas separados por cromatografía en capa fina por medio de reacciones químicas
7. Elucidar la estructura de las fracciones activas aisladas mediante la técnica espectroscópica de masas acoplada a cromatografía de gases

4.- MATERIAL Y MÉTODOS

4.1.- RECOLECCIÓN DE LAS PLANTAS E IDENTIFICACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

La recolección de *Ricinus communis*, *Euphorbia trigona*; *Jatropha dioica* y *Schinus molle*, se llevó a cabo en Santa Catarina NL. *Euphorbia pulcherrima* fue recolectada en San Nicolás de los Garza NL. La identificación de las plantas se realizó en el Herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas, donde se depositó una muestra para obtener los números de voucher correspondientes.

4.2.- EXTRACCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

La extracción de las plantas se llevó a cabo una vez que el material se secó a temperatura ambiente; las partes utilizadas de las plantas fueron las hojas de *S. molle* y *E. pulcherrima*, hojas y semillas de *R. communis*, tallo y raíz de *J. dioica* y tallo de *E. trigona*. Las partes de las plantas secas se trituraron en un molino por separado, posteriormente se tomaron 30 g de cada una y se depositaron en un matraz erlenmeyer de 500 mL donde se le adicionaron 150 mL de hexano y se selló herméticamente para evitar evaporación del mismo durante la extracción. Los principios activos del material seco y molido se extrajeron con solventes de diferente polaridad por 7 días con agitación constante. Se obtuvieron extractos en: hexano, acetona y etanol, el cambio de solvente se realizó a los 7 días de haber iniciado la extracción con el primer solvente sobre la planta previamente filtrada y el orden de adición de los solventes fue de menor a mayor polaridad. Los extractos obtenidos se evaporaron hasta sequedad a temperatura ambiente (Huacuja E. R., 1995; Velásquez C. 1997).

4.3.- PRUEBAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron los siguientes microorganismos: *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25619), *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* (ATCC 752), *Candida parapsilosis*, *Trichophyton tonsurans*, *Sporotrix schenkii* proporcionadas por la División de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del IMSS y el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la UANL.

4.3.1.- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Con los extractos obtenidos se realizaron las pruebas para la determinación de la actividad antimicrobiana sobre los microorganismos mencionados anteriormente. El método empleado para el ensayo microbiológico fue el de difusión en placa con discos de papel filtro. Las soluciones de prueba se esterilizaron por filtración con membranas de 0.25 μm (Koneman W., *et al* 1989).

4.3.2.- ACTIVACIÓN DE BACTERIAS

Para la activación de las bacterias se usó medio líquido preparado con 5 g de medio C. Rivas (patente en trámite No. 9810892) en 100 mL de agua destilada, ajustando a pH 7.0. Para el ensayo se utilizaron tubos de ensaye 18 X 150 mm a lo que se les agregaron 5 mL de medio a cada uno, se esterilizaron a 15 Lb/10 min, se inocularon con las diferentes cepas en estudio adicionando una asada a cada tubo previamente identificado y se incubaron durante 12-18 h a 37°C (Rivas C., 1998; Silva S. Y., 1999).

4.3.3.- CULTIVO DE BACTERIAS

Para el cultivo de bacterias se utilizó el medio sólido C. Rivas 8.5 g en 100 mL de agua destilada, se esterilizó y se adicionó sobre cajas Petri (20 mL) para posteriormente ser utilizadas en las pruebas de inhibición "*in vitro*" (Velásquez, C. C., 1997).

4.3.4.- ACTIVACIÓN DE HONGOS

Los hongos se activaron utilizando medio líquido preparado con 6.5 g de medio C. Rivas en 100 mL de agua destilada. Para el ensayo se utilizaron tubos de ensaye 18 X 150 mm se les agregaron 5 mL de medio a cada uno, se esterilizaron a 15 Lb/10 min, se inocularon con las diferentes cepas en estudio adicionando una asada a cada tubo previamente identificado, se incubaron de 2-15 días a 25 °C (Padrón B., 1999; Murphy C. M., 1999).

4.3.5.- MÉTODO DE DIFUSIÓN EN PLACA

Las pruebas microbiológicas se realizaron mediante el método de difusión en placa colocando 10 µL de cada uno de los extractos obtenidos, los cuales se prepararon a una concentración de 50 mg/mL en etanol absoluto en discos de papel filtro Whatman No. 1 sobre una placa sólida de medio C. Rivas, previamente inoculada con 100 µL de una suspensión bacteriana de 1×10^6 UFC o una asada con las diferentes cepas de hongos. Como control negativo se utilizó 10 µL del solvente empleado para disolver el extracto y 10 µL de cloranfenicol o ketoconazol como control positivo, para bacterias y hongos respectivamente. Las placas se incubaron a 37°C por 24 h; después de este período se midieron los halos de inhibición en mm para cada prueba (Rios J. L., *et al.*, 1988; Koneman W., *et al.*, 1989; Murphy C. M., 1999).

4.4.- SEPARACIÓN DE LAS FRACCIONES CON EFECTO INHIBITORIO

La separación de las fracciones de los extractos activos se realizó por cromatografía en capa fina (Huacuja E. R., 1995; Velásquez, C. C., 1997).

4.4.1.- CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA

Las placas cromatográficas se prepararon utilizando 10 g de sílica gel J. T Baker 7G en 40 mL agua destilada, ésta mezcla se colocó sobre placas de vidrio de 7.5 x 2.5 cm, después se secaron por un periodo de una hora en la estufa de secado (Felisa modelo F) a 110 °C. Una vez preparadas las placas cromatográficas se realizó la cromatografía utilizando un capilar para colocar la muestra, la placa se introdujo en una cámara de vidrio de boca ancha que contenía el eluyente éter de petróleo, benceno, acetona, metanol en una relación 9:9:2:2. El Rf se calculó midiendo la distancia del punto de aplicación de la muestra a la mitad de la mancha detectada y se dividió el valor obtenido sobre la distancia del punto de aplicación de la muestra y la distancia recorrida por el eluyente. (Huacuja E. R., 1995)

4.4.2.- AGENTES CROMOGÉNICOS

Se usó luz ultravioleta para observar el cromatograma y localizar los componentes, que no eran apreciables a la luz visible.

4.4.3.- IDENTIFICACIÓN DE LAS FRACCIONES CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR EL MÉTODO DE BIOAUTOGRAFÍA

Se utilizó la técnica de Hamburger modificada por Verastegui en 1998; se seleccionaron las cromatoplasmas en las cuales las fracciones mostraron mayor separación. En una caja Petri se colocó el cromatograma desarrollado con luz ultravioleta por una hora y sobre él se colocó una tira de medio sólido C. Rivas de 1x 6 cm x 0.3 mm de espesor para bacterias u hongos según fuera el caso, Posteriormente se añadieron sobre la tira de agar 150 µL de la dilución 1×10^6 UFC de la suspensión bacteriana o de hongos levaduriformes y una asada de la cepa en el caso de los hongos filamentosos y se distribuyó homogéneamente. Las condiciones de humedad se mantuvieron colocando dentro de una caja Petri algodón humedecido con agua destilada estéril. Se utilizó como control de crecimiento un cuadro de agar inoculado con el mismo microorganismo pero

separado del cromatograma. Las bacterias se incubaron 24 h a una temperatura de 37°C, las levaduras a 25 °C por 24 – 48 h, y los hongos filamentosos hasta 7 días a 25 °C y los hongos no filamentosos durante 24 a 48 h a 25 °C. La zona de inhibición de los microorganismos en la tira de agar se midió y se correlacionó con el registro previo de las fracciones separadas cromatográficamente (Hamburger M. O., 1987; Verastegui M. M., *et al.*, 1998).

4.5.- DETERMINACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD EN CÉLULAS DE MAMÍFERO

4.5.1.- MATERIAL CÉLULAR

Se emplearon las líneas celulares normales LLCPK-1 de riñón de cerdo, CHANG de hígado humano y OK de riñón de zarigüeya cultivadas en frascos de poliestireno de 25 cm² que contenían 4 ml de medio esencial mínimo (MEM) de Eagle, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y una mezcla de antibióticos (estreptomicina y penicilina).

4.5.2.- PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE CITOTOXICIDAD EN MICROPLACAS

En condiciones de esterilidad se lavaron las células con buffer de fosfatos salino (PBS) a 37 °C y se adicionó tripsina al 0.25 %, se incubó a 37°C durante 5-15 min, se inactivó la tripsina por adición de 5 mL de MEM con 10 % (SFB). Posteriormente la suspensión celular se centrifugó a 1000 rpm durante 10 min, se eliminó el sobrenadante con vacío y se resuspendió suavemente en 5-10 mL de medio con suero de acuerdo a la línea. Las células se contaron con un hemocitómetro y se preparó una suspensión celular para sembrar 25,000 cel/pozo en un volumen de 200 µL en microplacas de 96 pozos. Se incubó a 37 °C durante 24h para obtener una monocapa confluyente. Posteriormente se prepararon las diluciones de trabajo de las muestras en medio de cultivo sin suero y bajo condiciones de esterilidad, se retiró el medio de cultivo utilizando vacío y se lavó dos

veces con PBS a 37 °C, se agregaron 200 µL de medio preparado con las diluciones de las muestras. Se incubó a 37 °C y atmósfera húmeda por 24 h. Posteriormente se retiraron los tratamientos, se lavaron las células con PBS y se adicionó 100 µL de una mezcla 5:1 de Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio] MTT (2 mg/mL) y Metasulfato de fenazina (PMS, 3.5 mg/mL y se incubaron a 37 °C durante 75 min, después se decantaron los reactivos y se lavaron los pozos con 200 µL de PBS. Luego se agregaron 200 µL de alcohol isopropílico acidificado, se dejaron reposar las microplacas por 15 minutos y se resuspendió vigorosamente en alcohol. El sobrenadante se pasó a una placa nueva y se leyó la absorbancia en un lector de microplacas (EIA Multiwell Reader, Sigma Diagnostics) a 570 nm. La absorbancia fue directamente proporcional al número de células viables. A partir de las absorbancias obtenidas se determinó el porcentaje de viabilidad de cada línea celular probadas con los extractos y fracciones activas (Mosmann 1983, Conforti F., *et al.*, 2004; Rosa L. M., *et al.*, 2004).

4.6.- MÉTODOS QUÍMICOS DE IDENTIFICACIÓN

4.6.1.- PRUEBAS PARA GRUPOS FUNCIONALES

Para la realización de las pruebas se utilizaron soluciones a 50 mg/mL de los extractos y de las fracciones activas disueltas en etanol. (Rios J. L., 1988)

Prueba de Liebermann-Burchard: La prueba fue usada para determinar triterpenos y compuestos esteroidales. Se colocó una gota de la solución del extracto o la fracción activa sobre placas de porcelana de 12 pozos, se evaporó el solvente y posteriormente se agregó una gota de cloroformo y dos gotas del reactivo; posteriormente se observaron cambios de coloración. El reactivo se preparó utilizando una gota de ácido sulfúrico a una mezcla de 1.0 mL de anhídrido acético y 1.0 mL de cloroformo.

Prueba de Salkowski: Se usó para determinar esteroides y metilesteroides, es similar a la de Liebermann-Burchard, la muestra en cloroformo se puso en contacto con una gota de ácido sulfúrico, la prueba fue positiva si se desarrollaban colores amarillo o rojo.

Prueba de Shinoda: Se utilizó para identificación de compuestos de tipo flavonoide; 1.0 mg de la muestra se disolvió en etanol y unas limaduras de magnesio, se le aplicó calor (60 °C) y después unas gotas de HCl por las paredes. Se consideró positiva con la aparición de colores naranja, rojo, rosa, azul o violeta.

Prueba de Baljet: Para sesquiterpenlactonas, se utilizaron 2 soluciones que se mezclaron en volúmenes iguales antes de usarse, la solución A, un gramo de ácido pícrico en 100 mL de etanol; solución B, 10 g de hidróxido de sodio en 100 mL de agua. Para la prueba se colocó 10 mg de compuesto y unas 3-4 gotas de reactivo, la prueba fue positiva si se formaba una coloración naranja o roja oscura.

Prueba de Dragendorff: Se usó la modificación de Munier y Machelobuf para la determinación de alcaloides. Para ello se prepararon dos soluciones, la solución A con 0.85 g de nitrato de bismuto, los cuales se mezclaron con 10 mL de ácido acético glacial y 40 mL de agua y Solución B con 8 g de yoduro de potasio disuelto en 20 mL de agua. El reactivo se preparó mezclando 5 mL de A, 4 mL de B y 100 mL de agua, la prueba fue positiva si se presentan coloraciones rojo o naranja, persistentes por 24 h.

Prueba de bromo en tetracloruro de carbono: Para insaturaciones, a 2 mg de la muestra se le agregó una solución de bromo al 2 % en tetracloruro de carbono; la prueba se consideró positiva si la coloración de la solución desaparecía al principio.

Prueba del permanganato de Potasio: Para dobles enlaces, se preparó una solución de permanganato de potasio al 2 % en agua, se disolvieron 0.2 mg de muestra en agua, acetona, o metanol, se tomó con un capilar y se le agregó la solución de permanganato de potasio. La prueba fue positiva si se producía la decoloración del reactivo.

Prueba de 2,4- Dinitrofenilhidracina: Para grupo carbonilo. En un tubo de ensaye se disolvieron 50 mg de 2,4-dinitrofenilhidracina en 1 mL de etanol caliente. Se agregaron 50 mg del compuesto carbonílico y se calentó a baño María por 10 a 15 minutos; se dejó

en reposo y se enfrió en baño de hielo, la aparición de un precipitado indicó la presencia de un grupo carbonilo.

Prueba de Molisch: Para azúcares. En un tubo de ensaye se colocó la muestra, se añadieron 3 gotas del reactivo de Molisch, y se agitó. Después se inclinó el tubo y se depositaron por la pared 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. La prueba fue positiva si se formaba un anillo coloreado en la interfase. El reactivo se preparó disolviendo 1 g de α -naftol en 100 mL de etanol al 95 %. (Domínguez X. A., 1979; Huacuja E. R., 1995)

Prueba de NaOH: Para determinación de Lactonas. Se disolvieron 1-2 mg de muestra en solución alcohólica de NaOH al 10 %. La presencia de color naranja que desaparecía al agregar HCL indicó la presencia de un anillo lactónico. (Cruz V. D., 2002)

4.7.- MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

Se utilizó un espectrofotómetro de masas acoplado a cromatografía de gases para identificar los compuestos de las fracciones con efecto inhibitorio sobre los microorganismos en estudio. El análisis se realizó en un espectrofotómetro de masas gases HP19091J-433 Hewelwt Packard, Abonadle, PA utilizando columnas capilares de apolares de sílica fundida. (Domínguez, X. A., 1982)

4.8.- DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA

En una microplaca de 96 pozos se agregaron 100 μ L de medio líquido C. Rivas y se añadieron 100 μ L de cada una de las muestras partiendo de la concentración inicial de 1600 μ g/mL y se hicieron microdiluciones seriadas. Una vez realizadas las diluciones se adicionaron 100 μ L de la suspensión bacteriana o fúngica a una concentración de 1×10^6 UFC, que corresponde al tubo uno de la escala de Mc Farland. Posteriormente la microplaca se incubó por 24 h a 37 °C, luego se determinó la concentración mínima inhibitoria de cada una de las fracciones aplicando 40 μ L de una solución de MTT a una concentración de 2.5 mg/mL a cada pozo e incubando por 4 h a 37 °C, posteriormente se

observó la viabilidad microbiana de color púrpura de las diluciones probadas (Eloff, X., 1998; Gehrt A., *et al.*, 1995).

5.- RESULTADOS

5.1.- IDENTIFICACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

La identificación de las plantas se realizó en el Herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas, donde se depositó una muestra obteniéndose los siguientes números de voucher: UNL 023710, UNL 024176, UNL 023709, UNL023490 y UNL 024177 respectivamente para las especies *Ricinus communis*, *Euphorbia trigona*; *Jatropha dioica*, *Schinus molle* y *Euphorbia pulcherrima*.

5.2.- RENDIMIENTO OBTENIDO EN LA EXTRACCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

En los rendimientos de los extractos obtenidos se observó que el extracto más abundante fue el acetónico de semillas de *R. communis* seguido por el de hojas de la misma planta; las hojas de *S. molle* mostraron mayor rendimiento en el extracto acetónico; *E. trigona* mostró mayor rendimiento en el extracto hexánico, mientras que las hojas de *E. pulcherrima* se obtuvieron en forma más abundante en el extracto etanólico lo mismo que los extractos con este solvente de tallos y raíz de *J. dioica*. Los datos numéricos de rendimiento obtenido se observan en la tabla 1.

Tabla 1.- Porcentaje de rendimiento obtenido a partir de las especies utilizadas.

ESPECIE VEGETAL	% DE RENDIMIENTO		
	Hexánico	Acetónico	Etanólico
<i>Euphorbia trigona</i> (tallo)	1.67	0.96	0.82
<i>Euphorbia pulcherrima</i> (hoja)	2.41	2.70	3.39
<i>Jatropha dioica</i> (raíz)	0.54	2.37	3.13
<i>Jatropha dioica</i> (tallo)	1.03	1.88	2.58
<i>Ricinus communis</i> (hoja)	1.63	10.23	3.79
<i>Ricinus communis</i> (semilla)	5.10	14.68	6.83
<i>Schinus molle</i> (hoja)	7.29	8.39	2.23

5.3- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS PROBADOS

Los extractos que presentaron actividad con la mayoría de los microorganismos fueron los etanólicos de todas las plantas. Los resultados obtenidos muestran que el extracto etanólico de hojas de *S. molle* presenta actividad fuerte sobre *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* y *T. tonsurans*. El extracto etanólico de hojas de *R. communis* mostró un marcado efecto antimicrobiano sobre *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* y *C. parapsilosis* mientras que los extractos etanólico y acetónico de semilla de esta planta mostraron mayor actividad sobre *T. tonsurans*. De las tres polaridades de extracto obtenidas de la raíz de *J. dioica* se encontró que el extracto hexánico poseía actividad en un espectro más amplio sobre los microorganismos probados observándose un efecto inhibitorio fuerte con *S. aureus* y moderado con *E. coli*, *S. typhimurium*, *C. neoformans*, *C. albicans* y *S. schenkii*; sin embargo el hexánico de los tallos de *J. dioica* solo presentó actividad fuerte sobre *T. tonsurans*. *E. pulcherrima* mostró mayor efecto sobre *C. parapsilosis* y el extracto etanólico de tallo de *E. trigona* tuvo actividad moderada sobre *B. cereus*, *E. coli*, *S. aureus*. En las tablas 1-7 se muestran los resultados de las pruebas de la actividad antimicrobiana de los diferentes extractos. El control positivo utilizado fue cloranfenicol para bacterias y ketoconazol para hongos. La actividad antimicrobiana se midió en milímetros (mm), determinándose como débilmente activos aquellos extractos que presentaban de 5 a 10 mm de diámetro (+), medianamente activos aquellos que mostraban una inhibición de 10 a 15 mm (++), altamente activos aquellos que presentaron actividad antimicrobiana por arriba de 15 mm (+++).

Tabla 2.- Actividad antimicrobiana de los extractos de hojas de *S. molle*.

CEPAS PROBADAS	EXTRACTOS DE HOJAS DE <i>S. molle</i>			
	HEXANICO	ACETÓNICO	ETANÓLICO	CONTROL POSITIVO
<i>B. cereus</i>	-	-	-	+++
<i>E. coli</i>	-	++	+++	+++
<i>S. typhi</i>	-	-	-	+++
<i>S. aureus</i>	++	-	+++	+++
<i>P. aeruginosa</i>	+	-	-	+++
<i>E. aerogenes</i>	-	-	++	+++
<i>E. cloacae</i>	-	-	-	+++
<i>S. typhimurium</i>	-	-	++	+++
<i>C. neoformans</i>	-	-	-	+++
<i>C. albicans</i>	-	-	+++	-
<i>C. parapsilosis</i>	-	-	-	+++
<i>T. tonsurans</i>	++	++	+++	+++
<i>S. schenkii</i>	-	-	-	+++

Tabla 3.- Actividad antimicrobiana de los extractos de hojas de *R. communis*.

CEPAS PROBADAS	EXTRACTOS DE HOJAS DE <i>R. communis</i>			
	HEXANICO	ACETÓNICO	ETANÓLICO	CONTROL POSITIVO
<i>B. cereus</i>	-	-	+	+++
<i>E. coli</i>	-	-	+++	+++
<i>S. typhi</i>	-	-	+	+++
<i>S. aureus</i>	+	-	+++	+++
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	+++
<i>E. aerogenes</i>	-	-	-	+++
<i>E. cloacae</i>	+	++	-	+++
<i>S. typhimurium</i>	-	++	+	+++
<i>C. neoformans</i>	-	-	+	+++
<i>C. albicans</i>	-	++	+++	-
<i>C. parapsilosis</i>	-	-	+++	+++
<i>T. tonsurans</i>	-	-	-	+++
<i>S. schenkii</i>	+	-	-	+++

Tabla 4.- Actividad antimicrobiana de los extractos de semilla de *R. communis*.

CEPAS PROBADAS	EXTRACTOS DE SEMILLA DE <i>R. communis</i>			
	HEXANICO	ACETÓNICO	ETANÓLICO	CONTROL POSITIVO
<i>B. cereus</i>	-	+	-	+++
<i>E. coli</i>	-	-	++	+++
<i>S. typhi</i>	+	-	-	+++
<i>S. aureus</i>	-	+	-	+++
<i>P. aeruginosa</i>	-	+	-	+++
<i>E. aerogenes</i>	-	-	-	+++
<i>E. cloacae</i>	-	-	-	+++
<i>S. typhimurium</i>	-	-	-	+++
<i>C. neoformans</i>	-	+	-	+++
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	-	+	-	+++
<i>T. tonsurans</i>	-	+++	+++	+++
<i>S. schenkii</i>	-	-	-	+++

Tabla 5.- Actividad antimicrobiana de los extractos de raíz de *J. dioica*.

CEPAS PROBADAS	EXTRACTOS DE RAÍZ DE <i>J. dioica</i>			
	HEXANICO	ACETÓNICO	ETANÓLICO	CONTROL POSITIVO
<i>B. cereus</i>	-	-	+	+++
<i>E. coli</i>	++	-	+	+++
<i>S. typhi</i>	-	-	+	+++
<i>S. aureus</i>	+++	++	++	+++
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	+++
<i>E. aerogenes</i>	-	++	+	+++
<i>E. cloacae</i>	+	-	-	+++
<i>S. typhimurium</i>	++	-	-	+++
<i>C. neoformans</i>	++	-	-	+++
<i>C. albicans</i>	++	-	++	-
<i>C. parapsilosis</i>	+	-	+++	+++
<i>T. tonsurans</i>	-	-	-	+++
<i>S. schenkii</i>	++	++	++	+++

Tabla 6.- Actividad antimicrobiana de los extractos de tallo de *J. dioica*.

CEPAS PROBADAS	EXTRACTOS DE TALLO DE <i>J. dioica</i>			
	HEXANICO	ACETÓNICO	ETANÓLICO	CONTROL POSITIVO
<i>B. cereus</i>	-	-	+++	+++
<i>E. coli</i>	-	-	-	+++
<i>S. typhi</i>	-	-	-	+++
<i>S. aureus</i>	+	-	-	+++
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	+++
<i>E. aerogenes</i>	-	-	-	+++
<i>E. cloacae</i>	-	-	-	+++
<i>S. typhimurium</i>	-	-	-	+++
<i>C. neoformans</i>	-	-	+	+++
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	-	-	-	+++
<i>T. tonsurans</i>	+++	++	-	+++
<i>S. schenkii</i>	-	-	-	+++

Tabla 7.- Actividad antimicrobiana de los extractos de hojas de *E. pulcherrima*.

CEPAS PROBADAS	EXTRACTOS DE HOJAS DE <i>E. pulcherrima</i>			
	HEXANICO	ACETÓNICO	ETANÓLICO	CONTROL POSITIVO
<i>B. cereus</i>	-	-	+	+++
<i>E. coli</i>	-	-	-	+++
<i>S. typhi</i>	-	-	+	+++
<i>S. aureus</i>	++	++	-	+++
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	+++
<i>E. aerogenes</i>	-	-	+	+++
<i>E. cloacae</i>	-	-	-	+++
<i>S. typhimurium</i>	-	-	-	+++
<i>C. neoformans</i>	-	-	+	+++
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	-	+++	+	+++
<i>T. tonsurans</i>	-	++	-	+++
<i>S. schenkii</i>	-	-	-	+++

Tabla 8.- Actividad antimicrobiana de los extractos de tallo de *E. trigona*.

CEPAS PROBADAS	EXTRACTOS DE TALLO DE <i>E. trigona</i>			
	HEXANICO	ACETÓNICO	ETANÓLICO	CONTROL POSITIVO
<i>B. cereus</i>	-	-	++	+++
<i>E. coli</i>	-	-	++	+++
<i>S. typhi</i>	-	-	-	+++
<i>S. aureus</i>	+	-	++	+++
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	+++
<i>E. aerogenes</i>	-	++	-	+++
<i>E. cloacae</i>	-	-	+	+++
<i>S. typhimurium</i>	-	-	-	+++
<i>C. neoformans</i>	-	-	-	+++
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	-	-	-	+++
<i>T. tonsurans</i>	-	+++	-	+++
<i>S. schenkii</i>	-	+	-	+++

5.4.- SEPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS CON ACTIVIDAD INHIBITORIA

PRUEBAS CROMATOGRÁFICAS

Las cromatografías de los extractos etanólicos de *S. molle* y *R. communis* revelaron 7 y 8 fracciones a la luz visible y ultravioleta respectivamente; el extracto hexánico de la raíz de *J. dioica* reveló 6 fracciones visibles solamente a la luz ultravioleta; los colores observados se representan en las tablas 9 a 11 y en la figura 6 se observan las cromatografías obtenidas de los extractos anteriormente mencionados.

Tabla 9.- Fracciones separadas del extracto etanólico de hojas de *Ricinus communis*

FRACCIONES	RF	COLOR A LA LUZ VISIBLE	COLOR A LA LUZ ULTRA VIOLETA
1	0.11	Incoloro	Amarillo
2	0.28	Amarillo	Naranja
3	0.48	Verde bandera	Rojo
4	0.58	Amarillo claro	Amarillo
5	0.66	Verde bandera	Naranja
6	0.69	Verde claro	Naranja
7	0.74	Verde claro	Guindo
8	0.82	Verde oscuro	Naranja rojizo

Tabla 10.- Fracciones separadas del extracto etanólico de hojas de *Schinus molle*

FRACCIONES	RF	COLOR A LA LUZ VISIBLE	COLOR A LA LUZ ULTRA VIOLETA
1	0.12	Amarillo	Gris
2	0.52	Verde claro	Naranja
3	0.61	Verde claro	Café
4	0.71	Verde oscuro	Naranja rojizo
5	0.74	Verde olivo	Naranja rojizo
6	0.82	Verde claro	Naranja
7	0.88	Verde oscuro	Naranja

Tabla 11.- Fracciones separadas del extracto hexánico de raíz de *Jatropha dioica*

FRACCIONES	RF	COLOR A LA LUZ VISIBLE	COLOR A LA LUZ ULTRA VIOLETA
1	0.21	Incolora	Amarilla
2	0.36	Incolora	Verde limón
3	0.46	Incolora	Verde limón
4	0.52	Incolora	Amarilla
5	0.75	Incolora	Amarilla
6	0.84	Incolora	Azul

**Figura 6.-** Separación de las fracciones de los extractos con actividad antimicrobiana. De izquierda a derecha: extractos etanólicos de hojas de *R. communis* y de *S. molle* (observados a la luz visible) y extracto hexánico de raíz de *J. dioica* (observado a la luz ultravioleta).

IDENTIFICACIÓN DE LAS FRACCIONES CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR EL MÉTODO DE BIOAUTOGRAFÍA

Por medio del método de bioautografía se encontró que las fracciones con Rf de 0.36 y 0.46 presentaron actividad sobre *S. aureus*; mientras que la fracción con Rf de 0.84 mostró actividad contra *C. parapsilosis*. A pesar de que los extractos etanólicos de hoja de *R. communis* y *S. molle* mostraron actividad por el método de difusión en placa no se observó actividad alguna por las fracciones separadas de los mismos en el método de bioautografía. Los resultados de la actividad del extracto hexánico de la raíz de *J. dioica* se pueden observar en la tabla 12. En la figura 8 se muestra el efecto inhibitorio de las fracciones con Rf 0.36 y 0.46 sobre *S. aureus*, reveladas con MTT.

Tabla 12.- Actividad antimicrobiana de las fracciones del extracto hexánico de raíz de *J. dioica*

Microorganismos	FRACCIONES ACTIVAS DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE LA RAÍZ DE <i>J. dioica</i>		
	0.36	0.46	0.84
<i>B. cereus</i>	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-
<i>S. typhi</i>	-	-	-
<i>S. aureus</i>	+	+	-
<i>Pseudomonas sp</i>	-	-	-
<i>E. aerogenes</i>	-	-	-
<i>E. cloacae</i>	-	-	-
<i>S. typhimurium</i>	-	-	-
<i>C. neoformans</i>	-	-	-
<i>C. albicans</i>	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	-	-	+
<i>T. tonsurans</i>	-	-	-
<i>S. schenkii</i>	-	-	-

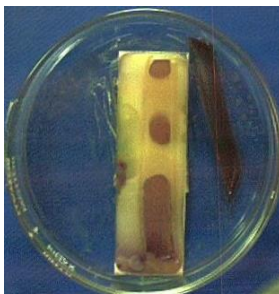


Figura 7.- Efecto inhibitorio sobre *S. aureus* presentado por las fracciones con Rf 0.36 y 0.46 reveladas con MTT.

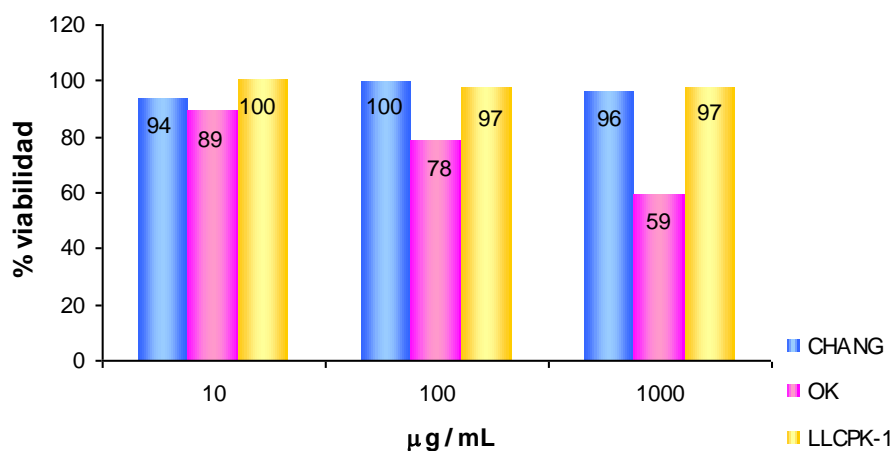
5.5.- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LOS EXTRACTOS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

El extracto etanólico de *R. communis* a las concentraciones de 10, 100 y 1000 $\mu\text{g/mL}$ no fue citotóxico sobre las líneas celulares CHANG (viabilidad de 94, 100 y 96 % respectivamente) y LLCPK-1 (97, 97 y 100%), sin embargo en la línea celular OK se observó disminución de la viabilidad dependiente de la dosis (89, 78 y 59 % respectivamente).

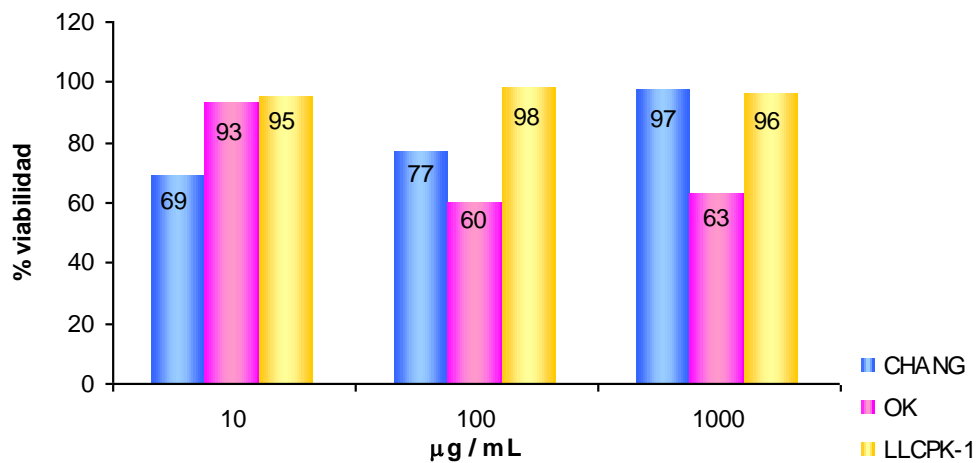
El extracto etanólico de *S. molle* presentó un efecto inverso en la proliferación celular sobre la línea celular CHANG ya que se observó una viabilidad de 69, 77 y 97 % a las concentraciones de 10, 100 y 1000 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Un efecto similar se observó en las células OK con 93, 60 y 63 % a las dosis mencionadas. No se observó citotoxicidad de éste extracto sobre las células LLCPK-1, en las cuales se observaron porcentajes de viabilidad de 96, 98 y 95 % a 10, 100 y 1000 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

El extracto hexánico de raíz de *J. dioica* a las concentraciones de 10, 100 y 1000 $\mu\text{g/mL}$ no fue citotóxico sobre las líneas celulares CHANG (viabilidad de 91, 86 y 74 % respectivamente) y LLCPK-1 (91, 93 y 84 %), sin embargo en la línea celular OK se observó disminución de la viabilidad dependiente de la dosis (78, 60 y 60 %).

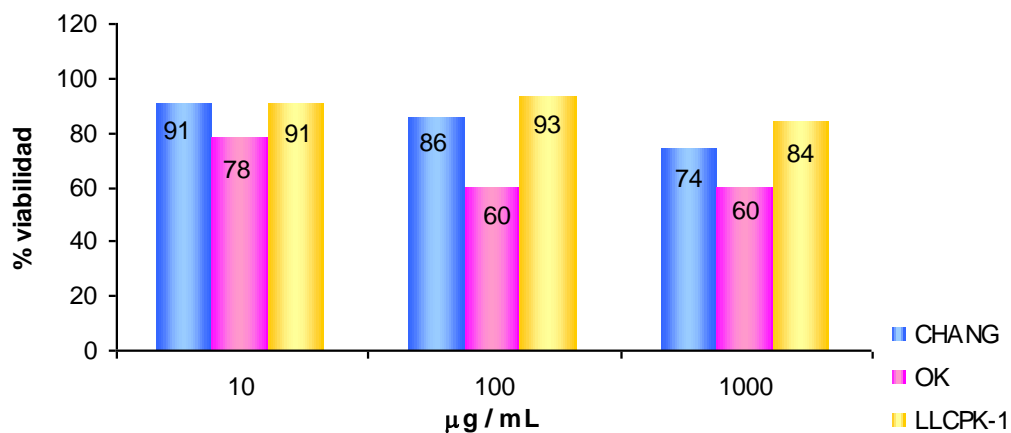
No se observó efecto citotóxico de la fracción 0.36 (10 µg/mL) proveniente del extracto hexánico de raíz de *J. dioica* sobre la línea LLCPK-1 (94 % de viabilidad) mientras que las fracciones 0.46 y 0.84 mostraron porcentajes de 97 y 102 % a esta misma concentración. A la concentración intermedia (100 µg/mL) se encontraron porcentajes de viabilidad de 88, 95 y 90 % para las fracciones 0.36, 0.46 y 0.84, lo que indica que estas fracciones no son citotóxicas. En la concentración de 1000 µg/mL se observaron porcentajes de viabilidad de 86, 85 y 82 para las fracciones 0.36, 0.46 y 0.84. Sobre las células OK, las fracciones 0.36, 0.46 (98%) y 0.84 (100%) no presentaron actividad citotóxica a la concentración de 10 µg/mL. Este mismo efecto fue observado en las concentraciones de 100 µg/mL (94, 97 y 93 % de viabilidad) y 1000 µg/mL (94, 97 y 93 %) con las fracciones 0.36, 0.46 y 0.84 respectivamente. Estos resultados se ilustran en las graficas 1-6.



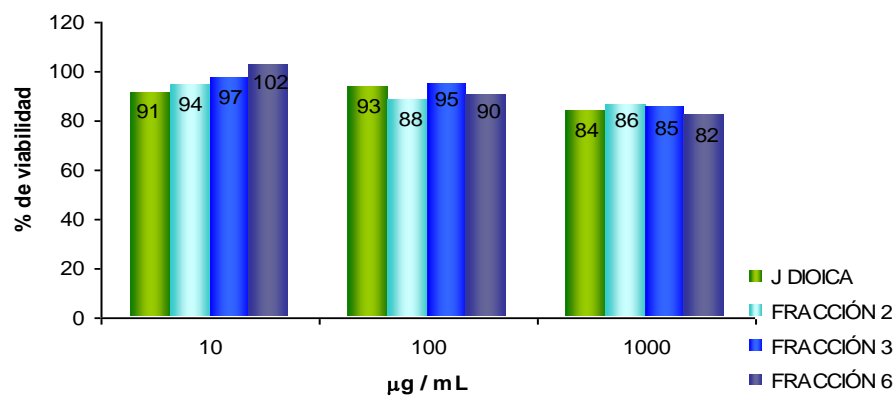
Gráfica 1.- Extracto etanólico de hojas de *R. communis* sobre las líneas celulares CHANG, OK y LLCPK-1.



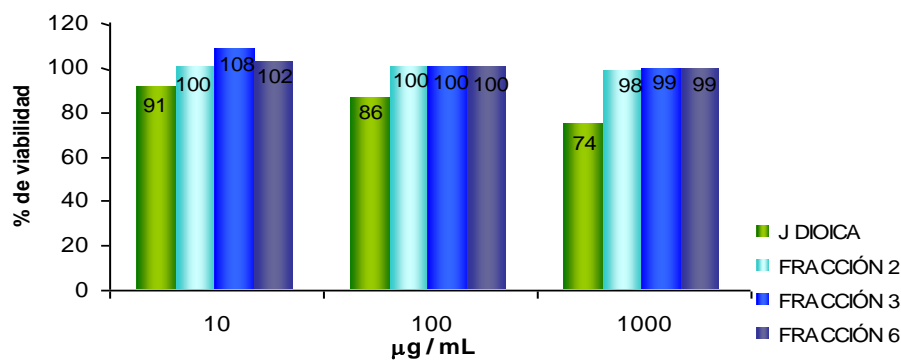
Gráfica 2.- Extracto etanólico de hojas de *Schinus molle* sobre las líneas celulares CHANG, OK y LLCPK-1.



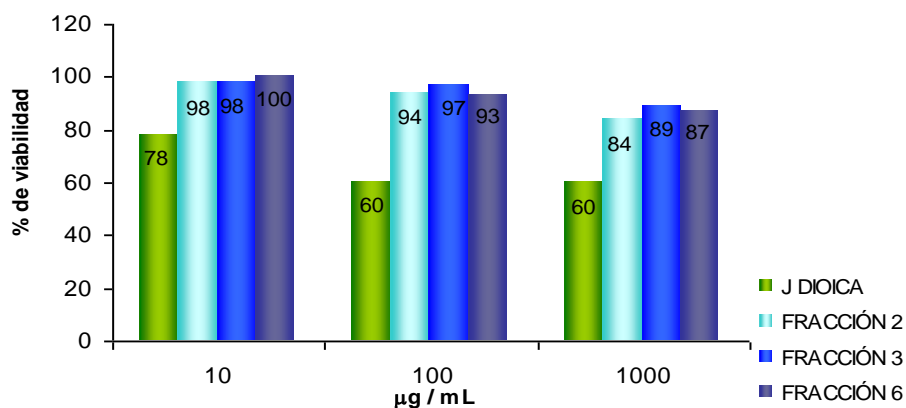
Gráfica 3.- Extracto hexánico de raíz de *Jatropha dioica* sobre las líneas celulares CHANG, OK y LLCPK-1.



Gráfica 4.- Efecto del extracto hexánico de la raíz de *Jatropha dioica* y las fracciones 2, 3 y 6 ($R_f = 0.36, 0.46$ y 0.84) sobre células LLCPK-1



Gráfica 5.- Efecto del extracto hexánico de la raíz de *Jatropha dioica* y las fracciones 2, 3 y 6 ($R_f = 0.36, 0.46$ y 0.84) sobre células CHANG



Gráfica 6.- Efecto del extracto hexánico de la raíz de *Jatropha dioica* y las fracciones 2, 3 y 6 ($R_f = 0.36, 0.46$ y 0.84) sobre células OK

5.6.- DETERMINACIÓN DE GRUPOS FUNCIONALES POR PRUEBAS QUÍMICAS

Se encontraron instauraciones en el extracto hexánico de la raíz de *J. dioica* (EHRJD) y en las fracciones 0.36 y 0.84 del mismo, así como en los extractos etanólicos de *S. molle* y *R. communis*. Se observaron triterpenos en el EHRJD y en la fracción con Rf de 0.36 y en los extractos etanólicos de hojas de *R. communis* y *S. molle* (EEHRC y EEHSM); además de coumarinas, sesquiterpenos y alcaloides. También se observó la presencia de esteroides en todos los extractos y fracciones así como de lactonas en las fracciones con Rf de 0.36 y 0.46. Se observó además la presencia de grupo carbonilo en las fracciones 0.36 y 0.84 así como en el extracto del cual provenían, y en los EEHRC y EEHSM. Así mismo se encontró que tanto en EHRJD como las fracciones probadas contenían carbohidratos. Estos resultados se resumen en la tabla 13.

Tabla 13.- Grupos funcionales presentes en los extractos y fracciones con actividad antimicrobiana.

PRUEBA QUÍMICA	GRUPO FUNCIONAL	EHRJD	F 2	F 3	F 6	EEHRC	EEHSM
KMnO ₄	Insaturaciones	+	+	-	+	+	+
Br / CCl ₄	Insaturaciones	+	+	-	-	-	+
Lieberman Burchard	Triterpenos	+	+	-	-	+	+
KOH	Coumarinas	-	-	-	-	+	+
Baljet	Sesquiterpenlactonas	-	-	-	-	+	+
Shinoda	Flavonoides	-	-	-	-	-	-
Salkowsky	Esteroides y metilesteroides	+	+	+	+	+	+
2,4 DNF	Grupo carbonilo	+	+	-	+	+	+
Dragendorf	Alcaloides	-	-	-	-	+	+
Molisch	Carbohidratos	+	+	+	+	-	-
CoCl ₂	Saponinas	-	-	-	-		
NaOH	Lactonas	-	+	+	-	-	-

EHRJD = Extracto hexánico de raíz de *J. dioica*, F1 = fracción con Rf de 0.36 del extracto hexánico de raíz de *J. dioica*, F2= fracción con Rf de 0.46 del extracto hexánico de raíz de *J. dioica*, F6 = fracción con Rf de 0.84 del extracto hexánico de raíz de *J. dioica* **EEHRC**= Extracto etanólico de hoja de *R. communis*, **EEHSM** = Extracto etanólico de hoja de *S. molle*.

5.7.- ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO DE MASAS ACOPLADO A CROMATOGRAFÍA DE GASES DE LAS FRACCIONES DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE LA RAÍZ DE *J. dioica* CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Los resultados de la cromatografía de gases acoplada al espectrofotómetro de masas mostraron que el pico de mayor altura se observó a un tiempo de retención de 20.86 min mientras que el análisis de masas reveló un rompimiento en M-18, el cual se observa en el pico de 396 m/z y el otro en M-43 que se observa en el pico de 145 m/z los cuales son característicos del Stigmast-5-en-3-ol con un peso molecular de 413 revelado por el pico base. Esto es por comparación de los picos obtenidos de la fracción con Rf de 0.84 del extracto hexánico de la raíz de *J. dioica* con el espectro de esta sustancia obtenida de la librería de la base de datos Wiley 275 L del equipo utilizado. Los resultados se observan en las figuras 8 y 9.

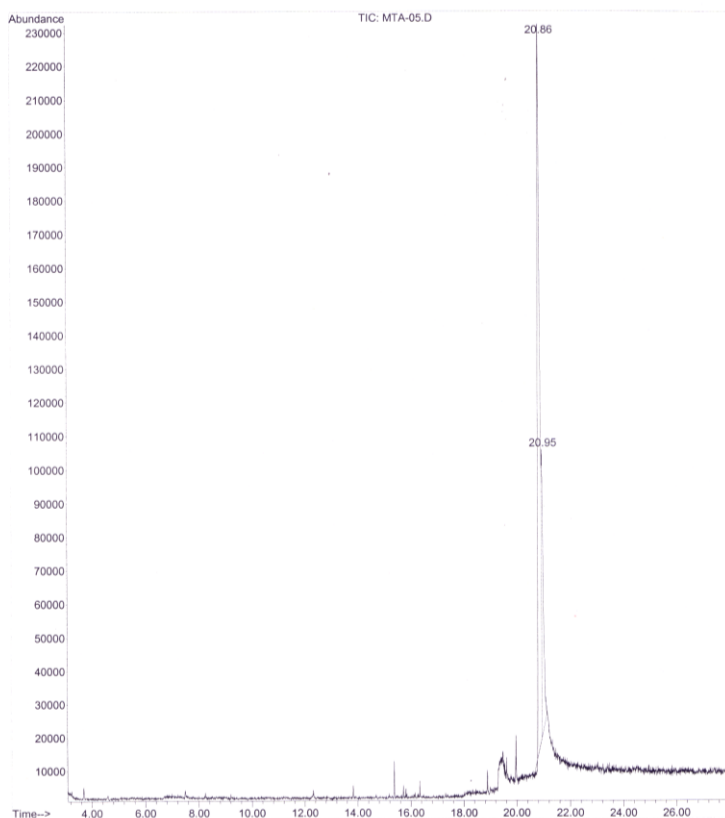


Figura 8.- Cromatografía de gases de la fracción con Rf 0.84 del extracto hexánico de *J. dioica*.

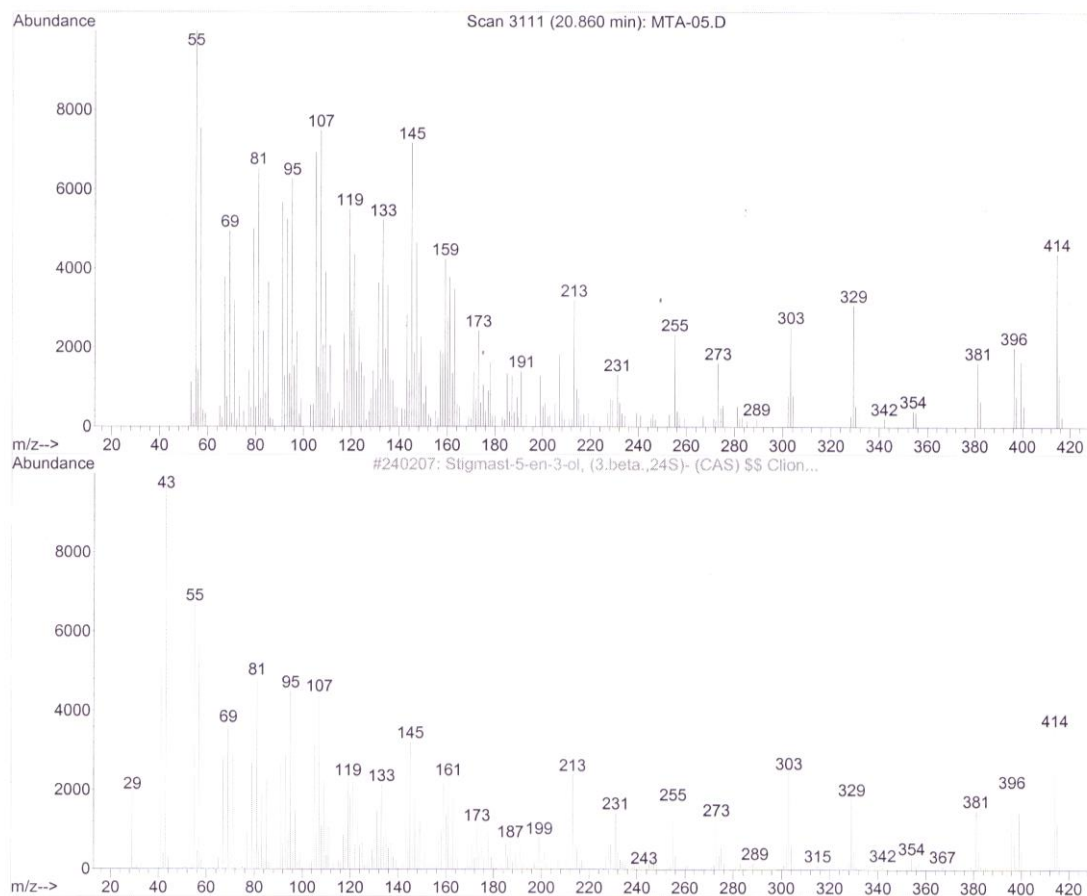


Figura 9.- Espectros de masas de la fracción con Rf de 0.84 del extracto hexánico de *J. dioica* (parte superior) y Stigmast-5-en-3-ol (parte inferior) reportados por el Software del equipo utilizado

5.8.- DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE LAS FRACCIONES ACTIVAS DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE *J. dioica*

La CMI de la fracción con Rf de 0.36 fue de 50 µg/mL sobre *C. neoformans*, y de 400, 200 y 100 µg/mL sobre *S. aureus*, *E. coli* y *C. albicans* respectivamente. Mientras que con la fracción con Rf de 0.46 y 0.84 se obtuvo una CMI de 25, 100, 200 y 400 µg/mL sobre *C. neoformans*, *C. albicans*, *E. coli* y *S. aureus*. Los controles utilizados presentaron CMIs de 5.0 y 20.0 µg/mL (fluconazol) sobre *C. neoformans* y *C. albicans* y 1.95 mg/mL (gentamicina) sobre *S. aureus* y *E. coli*. En la figura 10 se observan las CMI de las fracciones con actividad antimicrobiana sobre *S. aureus* y en la tabla 14 se ven las concentraciones mínimas inhibitorias de las fracciones activas del extracto hexánico de la raíz de *J. dioica*.

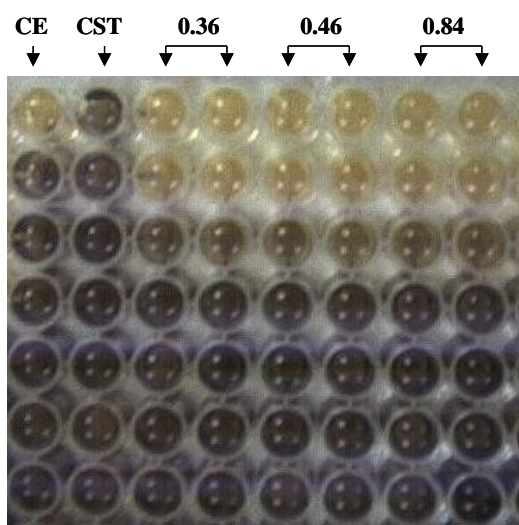


Figura 10.- CMI de las fracciones con actividad antimicrobiana sobre *S. aureus*. De izquierda a derecha se observan el control con etanol (CE) en la primer columna, control sin tratamiento en la segunda (CST); por duplicado las fracciones activas con Rf de 0.36, 0.46 y 0.84 a partir de la tercer columna.

Tabla 14.- Concentración mínima inhibitoria de las fracciones activas del extracto hexánico de la raíz de *J. dioica*

FRACCIÓN	MICROORGANISMOS PROBADOS			
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. neoformans</i>
0.36	400	200	100	50
0.46	400	200	100	25
0.84	400	200	100	25
gentamicina	1.95	1.95	NP	NP
fluconazol	NP	NP	20	5

NP = NO PROBADO

6.- DISCUSIÓN

Se tienen antecedentes de que *E. trigona* se utiliza en medicina tradicional para tratar sífilis y algunas enfermedades de piel causadas por hongos dermatofitos, lo que se puede relacionar con la actividad antimicrobiana presentada por el extracto etanólico sobre *B. cereus* y *E. coli* y del extracto acetónico de la misma sobre *T. tonsurans* aunque no se tengan reportes de la actividad antifúngica y antibacteriana de esta planta (Mitchell J. y G. Breyer, 1962).

Se ha reportado que *E. pulcherrima* posee actividad sobre bacterias, hongos y protozoarios (Smith K. I. et al., 1996) y que en los componentes de esta planta existen fenoles (Santucci B. et al., 1985; Massmanian A., 1998) los cuales son moléculas conocidas por su efecto antifúngico, esto podría explicar porqué el extracto acetónico de *E. pulcherrima* presentó mayor efecto sobre *C. parapsilosis*.

Los extractos etanólicos de hojas de *R. communis* presentaron mayor efecto sobre *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* y *C. parapsilosis*; esta actividad antimicrobiana se suma a la mencionada por Mitchell J. y G. Breyer (1962), quienes reportaron que la infusión de hojas presentaba efecto antimicrobiano sobre *Mycobacterium tuberculosis*. Los extractos acetónico y etanólico de la semilla de *R. communis* presentaron actividad relevante sobre *T. tonsurans*. Sin embargo las fracciones separadas de este extracto no mostraron actividad antimicrobiana por el método de bioautografía, lo que sugiere un efecto sinérgico entre los componentes de los extractos.

Aunque Sánchez O (1980) menciona a la ricina como uno de los venenos más potentes, esta sustancia no se encuentra en la hoja sino en la semilla, las pruebas de citotoxicidad revelaron que a las concentraciones de 10, 100 y 1000 µg/mL del extracto etanólico de *R. communis* la viabilidad fue de 94, 100 y 96 % sobre la línea celular CHANG. Sin embargo en las células OK se observó disminución de la viabilidad a medida que aumentaba la concentración, presentándose un 89, 78 y 59 % de células vivas en el mismo orden de concentración anteriormente mencionado. La línea LLCPK-1 no se vio significativamente afectada por el extracto ya que se obtuvo un 97 % de viabilidad en las

dos concentraciones mayores y un 100 % en la de 10 µg/mL. Lo anterior indica que el extracto de hojas de *R. communis* no es tóxico para la líneas CHANG y LLCPK-1, y que la citotoxicidad observada sobre las células OK puede deberse a otro componente presente en el follaje y no a la ricina.

Los extractos etanólicos de hojas de *S. molle* presentaron mayor efecto sobre sobre *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* y *T. tonsurans* esto se corrobora con lo mencionado por Gundidza M. (1999) quien observó que los extractos acuosos y etanólicos presentaban actividad contra *E. coli*, *S. aureus* y algunos hongos patógenos de granos de almacén; además del efecto antifúngico del aceite esencial de esta planta sobre *T. tonsurans* observado por Dikshit A. y cols. (1986).

A pesar de lo anterior la bioautografía realizada al extracto de hoja de *S. molle* no mostró actividad antimicrobiana, posiblemente por el sinergismo entre los compuestos presentes en los extractos crudos, el cual hace que el efecto se potencialice cuando se encuentran juntos.

Las pruebas para la determinación del efecto citotóxico demostraron que el extracto etanólico de *S. molle* presentaba un 95, 98 y 96 % de viabilidad para las dosis de 1000, 100 y 10 µg/mL respectivamente sobre las células LLCPK-1; además de presentar un efecto inverso en la proliferación celular de la línea celular CHANG ya que se observó un 69 % de células viables en la concentración de 10 µg/mL y 77 y 97 % en la de 100 y 1000. La viabilidad de la línea celular OK frente a este extracto fue de 93, 60 y 63 % a las concentraciones de 1000, 100 y 10 µg/mL. Los resultados mostrados mediante estas pruebas demuestran que este extracto no es citotóxico para ninguna de las líneas celulares ya que en todas las dosis probadas se observa una viabilidad mayor del 50 %. Sin embargo existe una selectividad en el efecto citotóxico sobre las líneas celulares probadas ya que de acuerdo a lo mencionado por Ruffa y cols. (2002), el extracto metanólico, de polaridad semejante al probado en este estudio presenta efecto sobre línea de carcinoma hepatocelular Hep G2 con una IC₅₀ de 50 ± 7 µg/mL.

Muchas especies de *Jatropha* han sido utilizadas en medicina tradicional por sus propiedades antisépticas y se han aislado compuestos como la 2-epi-jatrogrossidiona y el diterpenramnofolano, los cuales presentan actividad antimicrobiana (Can A., *et al.*, 2004). Con lo anteriormente mencionado y los resultados encontrados en este trabajo acerca de la actividad antimicrobiana, se relaciona el efecto mostrado por el extracto hexánico de raíz de *J. dioica* ya que es una especie perteneciente a este género y en este estudio reveló efecto antimicrobiano fuerte sobre *S. aureus*, moderado sobre *E. coli*, *S. typhimurium*, *C. albicans*, *C. neoformans* y *S. schenkii* y actividad débil sobre *C. parapsilosis* y *E. cloacae*. Dichos resultados concuerdan con los reportados por Villarreal A. M. y X. Domínguez (1988) quienes describieron esta actividad en *J. dioica* y otras especies de *Jatropha*, y lo observado por Sánchez C. A. (1995) quien encontró actividad de los extractos etanólicos de *Jatropha dioica* sobre *B. cereus* y *S. aureus*.

La fracción con Rf de 0.84 del extracto hexánico de raíz de *J. dioica* presentó actividad sobre *C. parapsilosis* por el método de bioautografía; mientras que las fracciones con Rf 0.36, 0.46 del mismo extracto presentaron actividad sobre *S. aureus*.

Aunque no se han presentado reportes acerca de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos o compuestos obtenidos de *J. dioica*, se sabe que los extractos hexánicos de la raíz de *J. multifida*, inhiben el crecimiento de *B. subtilis* y *S. aureus* a concentración de 200 µg/disco (Aiyelaagbe O., 2000; Levin Y., 2000), y que los extractos hexánicos, clorofórmicos y metanólicos de la raíz de *Jatropha podagrica* poseen actividad antimicrobiana a 20 mg/mL. También se sabe que los extractos hexánicos son más activos sobre *S. auerus* y *B. cereus* y tienen actividad moderada sobre *C. albicans* (Aiyelaagbe O., 2000); lo cual indica que los extractos hexánicos de la raíz de *J. dioica* son más activos sobre *C. albicans* que los de *J. podagrica*. Estos datos apoyan los resultados obtenidos en el presente trabajo, ya que de acuerdo a las pruebas realizadas para determinar la CMI de las fracciones activas con Rf de 0.36, 0.46 y 0.84 se encontró actividad a 100 µg/mL sobre *C. albicans* aunque no se haya presentado efecto sobre este microorganismo por bioautografía. Este último hecho puede ser explicado tomando como base que posiblemente existe una baja concentración de la

fracción en dicho método, además se observó una CMI de 200 µg/mL sobre *E. coli* y de 400 sobre *S. aureus*, al igual que el extracto de *J. multifida* sobre este último microorganismo. La fracción con Rf 0.36 mostró actividad sobre *C. neoformans* a 50 µg/mL, mientras que las fracciones 0.46 y 0.84 la presentaron a 25 sobre el mismo microorganismo.

Los resultados de las pruebas químicas revelaron la presencia de esteroides y metilesteroides en las 3 fracciones, así como en el extracto del cual provenían, las fracciones 0.36 y 0.84 revelaron la presencia de grupo carbonilo y de insaturaciones, además, la de 0.36 reveló la presencia de triterpenos, lo que se relaciona con lo obtenido por Villarreal A. M. y X. Domínguez. (1988) quienes determinaron la presencia de β-sitosterol (esterol) citlaltiriona (diterpeno) además de jatrofolona B y riolozatriona. También se han reportado compuestos de naturaleza semejante en otras especies de la familia euphorbiaceae, como el sitosterol encontrado en *Claoxylon polot* (Wai H. *et al.*, 1976), β-sitosterol-O-glucósido de los extractos metanólicos de *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) (Peres M.T. *et al.*, 1997), ácido diterpénico 9(11)-dehidrokaurenico y ácido hardwikiico en *Croton draco* (Murillo R. M. *et al.*, 2001).

Ajali U. y cols. (2002), observaron que los glucósidos esteroidales de las fracciones obtenidas por cromatografía en capa fina del extracto metanólico de *Euphorbia poissoni* presentaban actividad antimicrobiana por lo cual se supone que el Stigmast-5-en-3-ol revelado por espectroscopía de masas acoplada a cromatografía de gases en la fracción con Rf de 0.84 del extracto hexánico de raíz de *J. dioica* presenta dicha actividad ya que son compuestos de estructura semejante (Ajali U. *et al.*, 2002) y aunque no se tenían reportes de esta sustancia en esta especie vegetal se tiene antecedentes de que existe efecto antimicrobiano sobre *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis* y *P. aeruginosa* por esta sustancia en *Cosmos caudatus* especie no perteneciente a la familia Euphorbiaceae (Ragasa C. Y., *et al.*)

Aunque se ha observado que muchas especies de la familia Euphorbiaceae presentan componentes altamente tóxicos capaces de destruir células normales en mamíferos y

provocar severos cambios en la producción de plaquetas y prostaglandinas (Whelan L. C. y M. F. Ryan, 2003); los extractos y fracciones probadas sobre las líneas celulares normales CHANG, OK y LLCPK-1 no mostraron efecto citotóxico significativo. Esto es posiblemente debido a que existe selectividad de los componentes de la raíz de *J. dioica* sobre las células en las cuales actúa ya que se ha reportado inhibición del crecimiento de células de leucemia linfocítica (Villarreal A.M. y X. Domínguez, 1988). Sin embargo, en este estudio se observó que el efecto citotóxico es influenciado directamente por la concentración de los extractos y fracciones, ya que el extracto hexánico de raíz de *J. dioica* presentó mayor porcentaje de células vivas en la concentración más baja sobre las células de CHANG, el cual disminuyó conforme aumentaba la concentración ya que se obtuvieron porcentajes de células viables de 91, 86 y 74, mientras que para la línea OK se encontró 78, 60 y 60% de viabilidad y para la línea LLCPK-1 91, 93 y 84 (en las concentraciones de 10, 100 y 1000 respectivamente).

En las fracciones obtenidas del extracto hexánico de raíz de *J. dioica* sobre las células LLCPK-1 se observó que la fracción con Rf 0.36 del mismo presentaba un 94 % de células viables en la concentración de 10 µg/mL, comparada con la obtenida en el extracto que fue de 91%; mientras que las fracciones 0.46 y 0.84 mostraron porcentajes de 97 y 102 % en esta concentración. El valor de 102 % sugiere que existe un aumento en la proliferación de la línea celular con la fracción pura ya que en el extracto no se observa este efecto. A la concentración intermedia (100 µg/mL) se encontraron porcentajes de viabilidad de 88, 95 y 90 para las fracciones 0.36, 0.46 y 0.84, lo que indica que las fracciones no son citotóxicas comparadas con el extracto (93 %). En la concentración de 1000 µg/mL se observaron 86, 85 y 82 % de crecimiento celular de las fracciones 0.36, 0.46 y 0.84, mientras que el extracto presentó un 84 %.

Las fracciones 0.36 y 0.46 mostraron porcentajes de viabilidad de 98, mientras que la fracción con Rf de 0.84 un 100 % en la concentración de 10 µg/mL sobre las células OK, el cual difiere del 78 % presentado por el extracto. Esto sugiere que en el extracto crudo existe algún componente que aumenta la toxicidad sobre estas células. Este mismo efecto fue observado en las concentraciones de 100 y 1000 µg/mL debido a que se

obtuvo un 94, 97 y 93 % en la primera y 84, 89 y 87 en la segunda con las fracciones 0.36, 0.46 y 0.84 respectivamente comparado con el 60 % presentado en el extracto.

7.- CONCLUSIONES

- ✓ El extracto etanólico de hojas de *S. molle* fue activo contra *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* y *T. tonsurans* y no fue citotóxico para las líneas celulares normales LLCPK-1, OK y CHANG.
- ✓ El extracto etanólico hojas de *R. communis* mostró actividad biológica contra *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* y *C. parapsilosis* y no fue citotóxico para las líneas celulares normales LLCPK-1, OK y CHANG.
- ✓ El extracto etanólico *E. trigona* presenta actividad antimicrobiana sobre *B. cereus* y *E. coli* y el acetónico sobre *T. tonsurans*. Mientras que el extracto acetónico de *E. pulcherrima* presenta efecto sobre *C. parapsilosis*.
- ✓ El extracto hexánico de la raíz de *J. dioica* mostró actividad fuerte contra *S. aureus*, moderada sobre *E. coli*, *S. typhimurium*, *C. albicans*, *C. neoformans* y *S. schenkii* y actividad débil sobre *C. parapsilosis* y *E. cloacae*. Éste extracto no fue citotóxico contra líneas celulares normales.
- ✓ No se observó efecto de las fracciones de los extractos etanólicos de *S. molle* y *R. communis*, *E. trigona* y *E. pulcherrima*, a diferencia de la actividad presentada por los extractos crudos, lo que indica que existe sinergismo en los compuestos presentes en estos extractos.
- ✓ Se aislaron tres fracciones activas a partir del extracto hexánico de raíz de *J. dioica*, una con actividad sobre *C. parapsilosis* (25 µg/mL), *C. albicans* (100 µg/mL), *E. coli* (200 µg/mL) y *S. aureus* (400 µg/mL). Las otras dos fueron activas sobre *S. aureus* y *C. neoformans* (50 µg/mL). Estas fracciones presentaron esteroides, metilesteroides, grupo carbonilo e insaturaciones. La fracción con R_f de 0.84 del extracto hexánico de raíz de *J. dioica* reveló por espectroscopía de masas la presencia de Stigmast-5-en-3-ol.
- ✓ Con los resultados obtenidos se cumplen los propósitos planteados en esta investigación debido a que se probó que todas las plantas utilizadas presentaron efecto antimicrobiano y que los extractos con mayor actividad o fracciones aisladas de ellos no son citotóxicas sobre las líneas celulares normales LLCPK-1, OK y CHANG.

8.- PERSPECTIVAS DE LA INVESTIGACIÓN

Las perspectivas derivadas del presente trabajo son las siguientes:

- Buscar nuevos métodos de extracción de los compuestos con actividad para obtención de mejores rendimientos.
- Aislar e identificar los compuestos activos presentes en los extractos de *E. pulcherrima* y *E. trigona*.
- Determinar la CMI de los extractos etanólicos de hojas de *R. communis* y *S. molle* y del hexánico de raíz de *J. dioica*.
- Evaluar la actividad antimicrobiana y toxicidad de los extractos y fracciones aisladas *in vivo*.
- Investigar la actividad antimicrobiana de otras partes de las plantas estudiadas.
- Validar o descartar la acción de triterpenos, coumarinas, sesquiterpenlactonas y alcaloides como responsables de la acción antimicrobiana en los extractos de *R. communis* y *S. molle* observada en este estudio.

9.- BIBLIOGRAFÍA

Adolf W., H. J. Opferkuch and E. Hecker. Irritant phorbol derivates from four *Jatropha* species. *Phytochemistry*. 3 (1) : 129-132. 1984.

Ajali U., G. B Okide., K. C. Chukwurah. Antibacterial activity of *Euphorbia poissoni* pax extracts *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 64 (5): 477-80. 2002.

Aiyelaagbe O., E. K. Adesogan., O. Ekundayo, B. A. Adeniyi. The antimicrobial activity of roots of *Jatropha podagrica* (Hook). *Phytotherapy Research*. 14 (1): 60-2. 2000.

Argent R. H., Roberts L. M., Wales R., Robertus J. D., Lord J. .M. Introduction of a disulfide bond into ricin a chain decreases the cytotoxicity of the ricin holotoxin. *The journal of biological chemistry*. 269 (43): 26705-26710. 1994.

Bilboa M. Estudio Fitoquímico del *Schinus molle*. Tesis ITESM. Monterrey NL. pp 1. 1971.

Brickell C. Enciclopedia de plantas y flores más de 8000, plantas 4000 fotografías, la obra de consulta definitiva para todos los aficionados a la jardinería. Volumen I y Volumen II. 1ª edición. Ed. Grijalbo, México. pp 123, 471. 1989.

Brickell C. Enciclopedia de plantas y flores. Vol. II. Grijalbo México. Fitoquímica. Ed. Limusa, México. pp 94. 1992.

Can A. R., G. Erosa R, F. May P, L. Peña R and S. R. Peraza S. Bioactive from roots and leaves of *Jatropha gaumeri*. *Revista de la Sociedad Química de México*. 48 (11):14. 2004.

Cano. G. y Cano. Taxonomía de plantas superiores. 1ª edición. Ed. trillas. pp 253-254. 1994.

Carmona F. J. Contribución al estudio químico de *Schinus molle* (Pirul). Tesis ITESM. Monterrey NL. pp 2. 1970.

Castro O., J. M. Gutiérrez, M. Barrios, Castro I., Romero M., E. Umana. Neutralization of the hemorrhagic effect induced by *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) venom with tropical plant extracts. *Rev Biol Trop*. 47 (3):605-16. 1999.

Cateni F., J. Zilic, G. Falsone, G. Scialino, E. Banfi. New cerebrosides from *Euphorbia peplis* L.: antimicrobial activity evaluation. *Bioorg Med Chem Lett*. 15; 13 (24):4345-50. 2003.

Chatterjee A., C. Biswanath, T. Pascard and Pranget. Crystal Structure of lignan of *Jatropha gossypifolia*. *Phytochemistry*. 20 (8): 2047-2048. 1981.

Chattopadhyay D., G. Arunachalam, A. B. Mandal., T. K. Sur, S. C. Mandal, S. K. Bhattacharya. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of folklore: *Mallotus peltatus* leaf extract. *Journal of Ethnopharmacology*. 82 (2-3): 229-37. 2002.

Conforti F., G. Statti, R. Tundis, M. R. Loizzo, M. Bonesi, F. Menichini and P. J. Houghton. Antioxidant and cytotoxic activities of subsp. *Gussonei retama raetam*. *Phytoterapy*. 18: 585-587. 2004.

Crudu V., T. Arnadottir, D. Laticevski. Resistance to anti-tuberculosis drugs and practices in drug susceptibility testing in Moldova, 1995-1999. *Int J Tuberc Lung Dis*. 7 (4): 336-42. 2003.

Cruz-Vega D.E. Determinación de la actividad estabilizadora de microtúbulos en fracciones ricas en diterpenoides obtenidos mediante HPLC de extractos de hojas, tallos y corteza de *Taxus globosa*. Tesis FCB UANL. San Nicolás de los Garza NL. pp 1-4, 7-12, 32-34. 1996.

Cruz-Vega D.E. Análisis fitoquímico y caracterización parcial de compuestos con actividad estimuladora sobre macrófagos y/o actividad antimicrobiana en extractos de raíz, tallo y hoja de *Carlowrightia cordifolia* A. Gray. Tesis FCB UANL. San Nicolás de los Garza NL. pp 35-39. 2002.

Dikshit., A. Naqvi, A. A and Husain A. *Schinus molle*: anew source of natural fungitoxicant. Appl Environ Microbiol. 51 (5): 1085-1088. 1986.

DiCesare D., H. L. DuPont, J. J. Mathewson, D. Ashley, S. F. Martinez, J. E. Pennington, S. B. Porter. A double blind, randomized, placebo-controlled study of SP-303 (Provir) in the symptomatic treatment of acute diarrhea among travelers to Jamaica and Mexico. Am J Gastroenterol. 97(10): 2585-8. 2002.

Domínguez X. A., J. F. Carmona and R. Venegas. Lignoceric acid other compounds of *Schinus molle*. Phytochemistry. 10: 1687. 1970.

Domínguez X. A. Fitoquímica. Ed. Limusa, México. pp 94. 1979.

Domínguez, X. A. Química orgánica experimental. Ed. Limusa, México. pp 79-106. 1982.

Eloff J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. Planta Medica. 64: 711-713.1998.

Gehrt A., J. Peter, P. A. Pizzo and T. J. Walsh. Effect of increasing inoculum sizes filamentous fungi on MICs of antifungal agents by broth microdilution method. Journal of Clinical Microbiology. 33 (5) : 1302. 1995.

Gundidza, M. Antimicrobial activity of essential oil from *Schinus molle* Linn. Departament of Pharmacy, Faculty of Medicine, University of Zimbabwe, Harare. Cent Afr. Med. 11: 231-234. 1993.

Hamburger M. O., C. A. Cordell. A direct Bioautographic TLC assay compounds possessing antibacterial activity. *Journal of Natural Products*. 50 : 19-22. 1987.

Hernández D. L. y M. Rodríguez. Actividad antimicrobiana de plantas que crecen en cuba. *Rev cubana plant med.* (2): 44-7. 2001.

Hergenbahn M., S. Kusumoto, E. Hecker. On the active principles of the spurge family (Euphorbiaceae). Extremely skin-irritant and moderately tumor-promoting diterpene esters from *Euphorbia resinifera* Berg. *J Cancer Res Clin Oncol*. 108 (1): 98-109. 1984.

Hodoshima N., Y. Nakano, M. Izumi, N. Mitomi, Y. Nakamura, M. Aoki, A. Gyobu, S. Shibasaki, T. Kurosawa. Protective effect of inactive ingredients against nephrotoxicity of vancomycin hydrochloride in rats. *Drug Metab Pharmacokinet*. 19 (1): 68-75. 2004.

Huacuja E. R. Contribución al estudio Fitoquímico y determinación de la acción antimicrobiana de *Senecio candidissimus*. Tesis FCB UANL. San Nicolás de los Garza NL . pp 1-126. 1995.

Hylin J.W. and E. E Spenyer. *Schinus molle*, Chlorinium Compounds. *J. Ags Food Chem*. 4 (5): 515-19. 1966.

Irobi O. N., M. Moo Y., W. A. Anderson, S. O. Daramola. Antimicrobial activity of bark extracts of *Bridelia ferruginea* (Euphorbiaceae). *J Ethnopharmacol*. 43 (3): 185-90. 1994.

Kaistha K K. Structural studies on the triterpenes of *Schinus terebinthefolius*. *Journal of Pharmacology*. 51: 1136-1139. 1962.

King S. R., M. S. Tempesta. From shaman to human clinical trials: the role of industry in ethnobotany, conservation and community reciprocity. *Ciba Found Symp*. 185: 197-206; 206-13. 1994.

Koneman W., S. D. Allen, V. R. Dowell, M. Sommers. Diagnóstico microbiológico. 1ª edición. Ed. Médica Panamericana. pp 380-402. 1989.

Kramer F. L. The pepper tree *Schinus molle*. Econ Bot. 11: 322-323. 1957.

Maiti R. Plantas útiles en el municipio de Matehuala S.L.P; un estudio etnobotánico. F. C. B. U. A. N. L. San Nicolás de los Garza N.L. pp 85, 102. 1991.

Levin Y., Y. Sherer, H. Bibi, M. Schlesinger, E. Hay. Rare *Jatropha multifida* intoxication in two children. J Emerg Med. 19 (2): 173-5. 2000.

Levy S. B. The 2000 Garrod lecture. Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. J Antimicrob Chemother. 49 (1): 25-30. 2002.

Levy S. B., Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. Nat Med. 10 (12 Suppl): S122-9. 2004.

Livermore DM, Woodford N. Carbapenemases: a problem in waiting?. Curr Opin Microbiol. 3 (5): 489-95. 2000.

Malcom, J. Thompson and W. S. Bowers. Lupeol and 30-norlupan-3b-ol-20-one from the coating of the castor bean (*Ricinus communis*). Phytochemistry. 7 : 845-847. 1967.

Marjorie M. C. Plant Products as Antimicrobial Agents. Clinical Microbiology Reviews. 12 (4): 564-582. 1999.

Martínez M. Plantas útiles de México. 2 a edición. Ed. Botas. pp 221-227. 1936.

Martínez M. J., J. Betancourt, A. Gonzalez N., A. Jauregui. Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity. Journal of Ethnopharmacology. 52(3):171-4. 1996.

Mitchell J. and G. Breyer. The medicinal and poisonus plants of southern and eastern Africa. Second edition. E& S. LIVINSTONE LTD. Great Britain pp 429,430, 434. 1962.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 16; 65 (1-2): 55-63. 1983.

Mujumdar A. M., A.V. Misar. Anti-inflammatory activity of *Jatropha curcas* roots in mice and rats. Journal of Ethnopharmacology. 90 (1): 11-5. 2004.

Murphy C. M. Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews. 564-582. 1999.

Murillo R. M., J . Jakupovic, J. Rivera, V. H. Castro. Diterpenes and other constituents from *Croton draco* (Euphorbiaceae). Rev Biol Trop. 49 (1): 259-64. 2001.

Nordmann P., Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. Clin Microbiol Infect. 8 (6): 321-31. 2002.

Núñez M. S. *Schinus molle* fruit of and pepper adulteration threxit. Anales Bromatol (Madrid). 5: 345-8. 1953.

Nurit B., A. Nun, M. Mayer and Nathan S. Properties of laccase in *Schinus molle*. Phytochemistry. 20 : 407-408. 1981.

Padrón B. Aislamiento e identificación de compuestos de: *Melia azederach*, *Sizygium aromaticum* y *Cinammomun zeylanicum* con efecto inhibitorio sobre bacterias y hongos. Tesis FCB UANL. San Nicolás de los Garza, NL. pp 20. 1999.

Peres M. T., F. D. Monache., A. B. Cruz, M. G. Pizzolatti, R. A. Yunes. Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). Journal Ethnopharmacology. 56(3):223-6. 1997.

Phillipson J. D. Natural products as drugs. Transactions of the royal society of Tropical Medicine and Hygiene 88, supplement 1, 17-19. 1994.

Ponsinet G. and G. Ourisson. Aspects Particuliers de la Biosynthèse des triterpenes dans le latex D' Euphorbia. 1968. Phytochemistry. 7 : 757-764. 1967.

Ragasa C. Y., Z. D. Nacpil, B. A. Peñalosa, J. C. Coll and J. C. Rideout. Antimutagen and Antifungal Compounds from *Cosmos caudatus*. Abstract PJS.126 (3).1997.

Rios J. L., M. C. Recio and Villar. Screening methods for natural products UIT antimicrobial activity a review of literature. Journal of Ethnopharmacology. 23: 127-149. 1988.

Rivas C. Diseño de un medio de cultivo para la producción de biomasa de *Nocardia Brasiliensis* HUJEG-1 a escala piloto para la obtención de proteasas caseinolíticas. Tesis Fac. Med. UANL. Monterrey NL. XVII. 1998.

Rosa L. M., G. A. Statti, R. Tundis, F. Conforti, S. Ando, F. Menichini. Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Cirsium tenoreanum*. Phytoteraphy. 75: 577-580. 2004.

Ross S. Antimicrobial activity of some egyptian aromatic plants. Phytoteraphy. 51 : 201-205. 1980.

Ruffa M. J., G. Ferraro, M. L. Wagner, M. L. Calcagno, R. H. Campos, L. Cavallaro. Cytotoxic effect of argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma line. Journal of Ethnopharmacology. 7 (3) : 335-339. 2002.

Rzedowsky. J. Flora Fanerógama del valle de México. Ed. CECSA Vol. 1. pp 52. 1981.
Sánchez O. Flora del Valle de México. 4ª edición. Ed. Herrero. pp 236-241. 1980.

Sánchez, C. A. Efecto de Extractos de 33 Plantas sobre el crecimiento de 11 especies bacterianas causantes de enfermedades gastrointestinales. Tesis FCB UANL San Nicolás de los Garza NL. pp 20-22. 1995.

Sekula C., and Nes W. R. The identification of cholesterol and other steroids in *Euphorbia pulcherrima*. *Phytochemistry*. 19 : 1509-1512. 1980.

Seung H. L., T. Takashi, N. Gen and N. Itsuo. Hidrolisable Tannins *Euphorbia thymifolia*. *Phytochemistry*. 29: 3621-3635. 1990.

Silva S. Y. Análisis fitoquímico y efecto antimicrobiano de 2 especies de plantas tóxicas *Schinus molle* y *N. oleander*. Tesis FCB UANL. San Nicolás de los Garza NL. pp 23-30. 1999.

Smith K. I., J. M. Dornish, K. E. Malterud, G. Hvistendahl, C. Romming, O. C. Bockman, P. Kolsaker, Y. Stenstrom, A. Nordal. Cytotoxic triterpenoids from the leaves of *Euphorbia pulcherrima*. *Planta Medica*. 62 (4): 322-5. 1996.

Starratt A. N. Short communication the identification of long-chain alcohols from euphorbia species. *Phytochemistry*. 11: 293-294. 1972.

Stone R. P., W. J. Collins. *Euphorbia pulcherrima*: toxicity to rats. *Toxicon*, 9 : 301-302. 1971.

Taylor R. S., F. Edel, N. P. Manandhar, G. H. Towers. Antimicrobial activities of southern Nepalese medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 50 (2): 97-102. 1996.

Velásquez, C. C. Estudio Fitoquímico y actividad antimicrobiana de *Tiquilia canescens*. Tesis FCB UANL. San Nicolás de los Garza NL pp 10-15. 1997.

Verastegui M. M. A. M. J. Verde, J. S. García. Bioautografía para detectar la actividad antimicrobiana de los extractos de plantas. Revista de Sociedad de Química de México XXXIII Congreso Mexicano de Química XVII Congreso de Educación Química. pp 131. 1998.

Villacis L. Plantas Medicinales de México. 1ª edición. Ed. Época, S.A. DF. México. pp 67. 1978.

Villarreal A. M., X. Domínguez. Citlaltirione a new diterpene from *Jatropha dioica* var sessiflora. Journal of natural products. 51 (4) : 749-753. 1988.

Wai H., L. Man and L Yuk-Chuk. Triterpenoids two Hong Kong Euphorbiaceae species. Phytochemistry. 16 : 607-608. 1977.

Wang H., J. L. Dzink F., M . Chen, S. B. Levy. Genetic characterization of highly fluoroquinolone-resistant clinical *Escherichia coli* strains from China: role of *acrR* mutations. Antimicrob Agents Chemother. 45 (5): 1515-21. 2001.

Whelan L. C. and M. F. Ryan. Ethanolic extracts of *Euphorbia* and other ethnobotanical species as inhibitors of human tumour cell growth. Phytomedicine. 10 : 53-58. 2003.

Yougken W. Tratado de Farmacognosia. 1ª ed. Ed. Atlante. S.S. México D. F. pp 895-896. 1951.

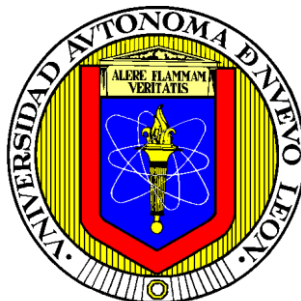
PUBLICACIONES:

Silva Belmares Yesenia, Oranday Cárdenas Azucena, Verde Star Julia, Cruz Vega Delia Elva, Rivas Morales Catalina, Carranza Rosales Pilar. Fracciones con actividad antimicrobiana de los extractos de *Jatropha dioica*, *Ricinus communis* y *Schinus molle*. Revista Salud Pública y Nutrición. Ed. Esp. No.2-2003. Pág 77.

Q.B.P. Sonia Yesenia Silva Belmares, Dra. Catalina Rivas Morales, Dra. Azucena Oranday Cárdenas, Dra. María Julia Verde Star, Dra. Delia Elva Cruz Vega, M.C. Pilar Carranza Rosales. Determinación de la actividad antimicrobiana y citotóxica de las fracciones obtenidas de extracto hexánico de la raíz de *Jatropha dioica*. Revista Salud Pública y Nutrición. Ed. Esp. No.3-2004. Pág 2.

Delia Cruz-Vega, Yesenia Silva-Belmares, Azucena Oranday-Cárdenas, Catalina Rivas-Morales, Julia Verde-Star, Pilar Carranza-Rosales, Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Jatropha dioica*. Revista de la Sociedad Química de México (Artículo en revisión).

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES QUE PRESENTEN
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y CITOTÓXICA DE *Euphorbia
pulcherrima*, *Euphorbia trigona*, *Jatropha dioica*, *Ricinus communis* y *Schinus
molle***

POR

QBP Sonia Yesenia Silva Belmares

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en la División de Biología Celular y Molecular del CIBIN, IMSS y En el laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL. Bajo la dirección interna de la Dra. Catalina Rivas Morales, la dirección externa de la Dra. Delia Elva Cruz Vega y bajo la codirección de la Dra. Azucena Oranday Cárdenas. Fungieron como asesoras la Dra. Ma. Julia Verde Star y la Dra. Pilar Carranza Rosales

Dedicatorias

A Dios

Quien me permitió terminar una meta más en mi vida

A mis padres y Hermanos

Por su apoyo incondicional y por creer en mi

A Rodolfo Quintanilla

Por depositar su confianza en mi y la motivación brindada día a día

A mis eternos amigos y compañeros de laboratorio

Bety, Ezequiel, Lupita, Laura, Vicky, Paty, Gloria, Hugo, Bibiana, Doris, Ruth, Ramón, Juan José, Ledy con quien compartí muchas experiencias gracias a todos por el animo brindado.

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a:

Dra. Catalina Rivas Morales por fungir como directora de mi tesis y por el apoyo brindado desde los inicios de mi carrera y por su apoyo constante en la realización de este trabajo.

Dra. Azucena Oranday Cárdenas por sus apreciable colaboración como asesor y sus valiosas sugerencias durante la realización del presente trabajo.

Dra. Ma. Julia Verde Star por su gran apoyo para la realización de esta investigación y sus muchas enseñanzas.

Dra. Delia Elva Cruz Vega por su gran apoyo, motivación y tiempo dedicado para sacar adelante este proyecto de tesis.

Dra. Pilar Carranza Rosales por sus sugerencias y motivación constante para la culminación de esta tesis.

Agradecimientos

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el soporte económico para la realización de mi doctorado

Centro de Investigación Biomédica de Noreste del IMSS, por el apoyo recibido para el desarrollo de este estudio

Agradecimientos

Mi Agradecimiento siempre a:

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Por la oportunidad que me brindó no solo para la realización de mi trabajo de investigación, si no por permitirme crecer y formarme como persona.

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Por el apoyo otorgado en la utilización de su equipo e instalaciones para la realización de este proyecto de investigación.

DIVISIÓN DE POSTGRADO

Por las facilidades dadas en toda ocasión ameritada para la obtención de documentación o información.

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

En especial a la División de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste. Por todos los medios brindados en el desarrollo de esta tesis.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
LUGAR DE TRABAJO	I
DEDICATORIAS	II
AGRADECIMIENTOS	III
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1.- INTRODUCCIÓN	3
2.- ANTECEDENTES	6
2.1.- Compuestos de plantas con actividad antimicrobiana	6
2.2.- Actividad biológica y compuestos activos de plantas de la familia euphorbiaceae	7
2.3.- Actividad biológica y compuestos activos de plantas de la familia anacardiaceae	14
2.4.- JUSTIFICACIÓN	17
2.5.- Plantas utilizadas en el estudio	18
2.6.- HIPOTESIS	23
3.- OBJETIVO GENERAL	24
3.1- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4.- MATERIAL Y MÉTODOS	25
4.1.- Recolección de las plantas e identificación del material vegetal	25
4.2.- Extracción del material vegetal	25
4.3.- Pruebas de actividad antimicrobiana	25
4.3.1.- Determinación de la actividad antimicrobiana	26

4.3.2.- Activación de bacterias	26
4.3.3.- Cultivo de bacterias	26
4.3.4.- Activación de hongos	27
4.3.5.- Método de difusión en placa	27
4.4.- Separación de las fracciones con efecto inhibitorio	27
4.4.1.- Cromatografía en capa delgada	28
4.4.2.- Agentes cromogénicos	28
4.4.3.- Identificación de las fracciones con actividad antimicrobiana por el método de bioautografía	28
4.5.- Determinación de la citotoxicidad en células de mamífero	29
4.5.1.- Material celular	29
4.5.2.- Procedimiento para la determinación de citotoxicidad en microplacas	29
4.6.- Métodos químicos de identificación	30
4.6.1.- Pruebas para grupos funcionales	30
4.7.- Métodos espectroscópicos	32
4.8.- Determinación de la concentración mínima inhibitoria	32
5.- RESULTADOS	34
5.1.- Identificación del material vegetal	34
5.2.- Rendimiento obtenido en la extracción del material vegetal	34
5.3.- Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos probados	35
5.4.- Separación de los extractos con actividad inhibitoria	39
5.5.- Determinación de la actividad citotóxica de los extractos con actividad antimicrobiana	42
5.6.- Determinación de grupos funcionales por pruebas químicas	46
5.7.- Análisis espectroscópico de masas acoplado a cromatografía de gases de las fracciones del extracto hexánico de la raíz de <i>J. dioica</i> con actividad antimicrobiana	47
5.8.- Determinación de la concentración mínima inhibitoria de las fracciones activas del extracto hexánico de <i>J. dioica</i>	49
6.- DISCUSIÓN	51
7.- CONCLUSIONES	57

8.- PERSPECTIVAS DE LA INVESTIGACIÓN	58
9.- BIBLIOGRAFÍA	59

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	<i>Jatropha dioica</i>	22
2.	<i>Ricinus communis</i>	22
3.	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	22
4.	<i>Euphorbia trigona</i>	22
5.	<i>Schinus molle</i>	22
6.	Separación de las fracciones de los extractos con actividad antimicrobiana	40
7.	Efecto inhibitorio sobre <i>S. aureus</i> presentado por las fracciones con Rf 0.36 y 0.46 reveladas con MTT	42
8.	Cromatografía de gases de la fracción con Rf 0.84 del extracto hexánico de <i>J. dioica</i>	47
9.	Espectros de masas de la fracción con Rf de 0.84 del extracto hexánico de <i>J. dioica</i> (parte superior) y Stigmast-5-en-3-ol (parte inferior) reportados por el Software del equipo utilizado	48
10.	CMI de las fracciones con actividad antimicrobiana sobre <i>S. aureus</i> . De izquierda a derecha se observan el control con etanol (CE) en la primer columna, control sin tratamiento en la segunda (CST); por duplicado las fracciones activas con Rf de 0.36, 0.46 y 0.84 a partir de la tercer columna	49

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Porcentaje de rendimiento obtenido a partir de las especies utilizadas	34
2.	Actividad antimicrobiana de los extractos de hojas de <i>S. molle</i>	36
3.	Actividad antimicrobiana de los extractos de hojas de <i>R. communis</i>	36
4.	Actividad antimicrobiana de los extractos de semilla de <i>R. communis</i>	37
5.	Actividad antimicrobiana de los extractos de raíz de <i>J. dioica</i>	37
6.	Actividad antimicrobiana de los extractos de tallo de <i>J. dioica</i>	38
7.	Actividad antimicrobiana de los extractos de hojas de <i>E. pulcherrima</i>	38
8.	Actividad antimicrobiana de los extractos de tallo de <i>E. trigona</i>	39
9.	Fracciones separadas del extracto etanólico de hojas de <i>Ricinus communis</i>	39
10.	Fracciones separadas del extracto etanólico de hojas de <i>Schinus molle</i>	40
11.	Fracciones separadas del extracto hexánico de raíz de <i>Jatropha dioica</i>	40
12.	Actividad antimicrobiana de las fracciones del extracto hexánico de raíz de <i>J. dioica</i>	41
13.	Grupos funcionales presentes en los extractos y fracciones con actividad antimicrobiana	46
14.	Concentración mínima inhibitoria de las fracciones activas del extracto hexánico de la raíz de <i>J. dioica</i>	50

LISTA DE GRAFICAS

Gráfica		Página
1.	Extracto etanólico de hojas de <i>R. communis</i> sobre las líneas celulares CHANG, OK y LLCPK-1	43
2.	Extracto etanólico de hojas de <i>Schinus molle</i> sobre las líneas celulares CHANG, OK y LLCPK-1	44
3.	Extracto hexánico de raíz de <i>Jatropha dioica</i> sobre las líneas celulares CHANG, OKI y LLCPK-1	44
4.	Efecto del extracto hexánico de la raíz de <i>Jatropha dioica</i> y las fracciones 2, 3, 4 y 6 ($R_f = 0.36, 0.46, 0.52$ y 0.84) sobre células LLCPK-1	45
5.	Efecto del extracto hexánico de la raíz de <i>Jatropha dioica</i> y las fracciones 3, 4 y 6 ($R_f = 0.36, 0.46, 0.52$ y 0.84) sobre células CHANG	45
6.	Efecto del extracto hexánico de la raíz de <i>Jatropha dioica</i> y las fracciones 2, 3, 4 y 6 ($R_f = 0.36, 0.46, 0.52$ y 0.84) sobre células OK	45

ABREVIATURAS

CHANG	Células de hígado humano
OK	Células de riñón de zarigüeya
LLCPK-1	Células de riñón de cerdo
ATCC	American Type Culture Collection
MTT	Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio]
Rf	Frente de referencia
IC ₅₀	Concentración inhibitoria 50
µg	Microgramos
mL	Mililitros
INC	Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos
g	Gramos
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
mg	Miligramos
µm	Micrómetros
Lb	Libras
min	Minutos
H	Horas
°C	Centígrados
µL	Microlitros
UFC	Unidades formadoras de colonia
CCF	Cromatografía en capa fina
mm	Milímetros
PBS	Buffer de fosfatos salino
DMSO	Dimetilsulfóxido
cel	Célula
cc	Centímetros cúbicos
SFB	Suero fetal bovino
rpm	Revoluciones por minuto

PMS	metasulfato de fenacina
nm	Nanómetros
HCl	Ácido clorhídrico
Na OH	Hidróxido de sodio
CMI	Concentración mínima inhibitoria
EHRJD	Extracto hexánico de raíz de <i>J. dioica</i>
F1	Fracción con Rf de 0.36 del extracto hexánico de raíz de <i>J. dioica</i>
F2	Fracción con Rf de 0.46 del extracto hexánico de raíz de <i>J. dioica</i>
F6	Fracción con Rf de 0.84 del extracto hexánico de raíz de <i>J. dioica</i>
EEHRC	Extracto etanólico de hoja de <i>R. communis</i>
EEHSM	Extracto etanólico de hoja de <i>S. molle</i>